

APR 11 2007



HAMRE, SCHUMANN, MUELLER & LARSON, P.C.

AN INTERNATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

FAX TRANSMISSION April 11, 2007

TO: Mail Stop: AMENDMENT
Examiner: P. Martin
Commissioner for Patents
PO Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

FROM: Douglas P. Mueller

OUR REF: 10873.1574USWO

TELEPHONE: (612) 455.3800

Total pages, including cover letter: 63

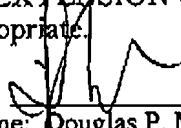
PTO FAX NUMBER: 571.273.8300

If all pages are NOT received, please call us at 612.455.3800 or fax us at 612.455.3801.

Title of Document: **Information Disclosure Statement, Form 1449, 2 references, copy of Japanese Office Action**

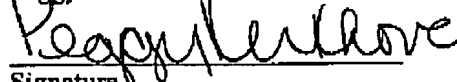
Applicant: YONEHARA, et al.
Serial No.: 10/521,234
App. Filed: January 13, 2005
Group Art No.: 1651
Confirmation No.: 8752

Please charge any additional fees or credit overpayment to Deposit Account No. 50-3478. Please consider this a PETITION FOR EXTENSION OF TIME for a sufficient number of months to enter these papers, if appropriate.

By: 
Name: Douglas P. Mueller
Reg. No.: 30,300

I hereby certify that this paper is being transmitted by facsimile to the U.S. Patent and Trademark Office on the date shown below.

Peggy J. Kerkhove


Signature

April 11, 2007
Date

225 SOUTH SIXTH STREET - SUITE 2650 - MINNEAPOLIS - MN 55402
TEL. 612.455.3800 - FAX 612.455.3801
WWW.HSML.COM - MAIL@HSML.COM

RECEIVED
CENTRAL FAX CENTER
APR 11 2007IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: YONEHARA, et al. Examiner: K. Ariani
Serial No.: 10/521,234 Group Art Unit: 1651
Filed: January 13, 2005 Docket: 10873.1574USWO
Title: METHOD OF DEGRADING PROTEIN USING SULFONIC ACID
COMPOUND

CERTIFICATE UNDER 37 CFR 1.6(d): I hereby certify that this paper is being transmitted by facsimile to the
U.S. Patent and Trademark Office on April 11, 2007

By:

Name: Peggy KerthoveINFORMATION DISCLOSURE STATEMENT

Mail Stop Amendment
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

With regard to the above-identified application, the items of information listed on the enclosed Form 1449 are brought to the attention of the Examiner. The references were recently cited in a Japanese Office Action mailed March 13, 2007. A copy of the office action is enclosed. On July 7, 2006, Applicants cited US 6,200,773 which is the English equivalent of JP 2001-292795, which was cited in the Japanese Office Action. Also on July 7, 2006, the Applicants cited US 2002/025546 which is the English equivalent of JP 2000-210100, which is cited in the Japanese Office Action. Copies of any foreign patent documents or "Other Documents" are enclosed.

A concise explanation of the relevance of each non-English language document or other information is as follows (37 C.F.R. §(a)(3)):

US 2004/063213 is an English equivalent of WO 02/27331. An English abstract has been included for JP 60-168050.

In accordance with the provisions of 37 C.F.R. §1.97, this statement is being filed (CHECK ONE):

- ☐ (1) within three (3) months of the Filing Date, before the mailing date of a First Office Action on the merits, or before the mailing date of a First Office Action on the merits after the filing of a request for continued examination under 37 C.F.R. §1.114; or
- ☒ (2) after the period defined in (1) but before the mailing date of a Final Rejection or Notice of Allowance, and
- ☒ the requisite Statement is below, OR

RECEIVED
CENTRAL FAX CENTER

- ☐ the requisite fee of \$180.00 under Rule 1.17(p) is included herein, or **APR 11 2007**
- ☐ (3) after the mailing date of a Final Rejection or Notice of Allowance but on or before the payment of the Issue Fee, AND the requisite Statement is below AND the requisite fee of \$180.00 under Rule 1.17(p) is included herein.

STATEMENT

Applicants hereby state that:

- ☒ Each item of information contained in the Information Disclosure Statement was first cited in a communication from a foreign patent office in a counterpart application or by the USPTO in a related application not more than three months prior to the filing date of the Information Disclosure Statement
- ☒ If this box is checked, Applicant provides the following:
- Certification Under 37 C.F.R. §1.704(d)**
- In accordance with 37 C.F.R. §1.704(d), the undersigned hereby certifies that each item listed on the enclosed Form 1449 was first cited in a communication from a foreign patent office in a counterpart application, and that this communication was not received by any individual designated in 37 C.F.R. §1.56(c) more than thirty (30) days prior to the filing of this Information Disclosure Statement.
- ☐ The Examiner is hereby advised of the following co-pending U.S. applications. A copy of each U.S. patent application publication (if published) or application (if not published) is enclosed.

Application No.Filing DateGroup

No representation is made that a reference is "prior art" within the meaning of 35 U.S.C. §§ 102 and 103 and Applicants reserve the right, pursuant to 37 C.F.R. § 1.131 or otherwise, to establish that the reference(s) are not "prior art." Moreover, Applicants do not represent that a reference has been thoroughly reviewed or that any relevance of any portion of a reference is intended.

Consideration of the items listed is respectfully requested. Pursuant to the provisions of M.P.E.P. 609, it is requested that the Examiner return a copy of the attached Form 1449, marked as being considered and initialed by the Examiner, to the undersigned with the next official communication.

RECEIVED
CENTRAL FAX CENTER

APR 11 2007

FEE AUTHORIZATION

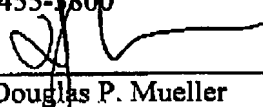
Should any fee associated with the submission of this paper not be attached hereto as a check, the Commissioner is authorized to charge the missing fee to our Deposit Account, No. 50-3478. Any overpayments should be credited to said Deposit Account.

Respectfully submitted,

HAMRE, SCHUMANN, MUELLER &
LARSON, P.C.
P.O. Box 2902-0902
Minneapolis, MN 55402-0902
(612) 455-3800

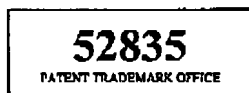
Dated: April 11, 2007

By:



Douglas P. Mueller
Reg. No. 30,300

DPM/pjk



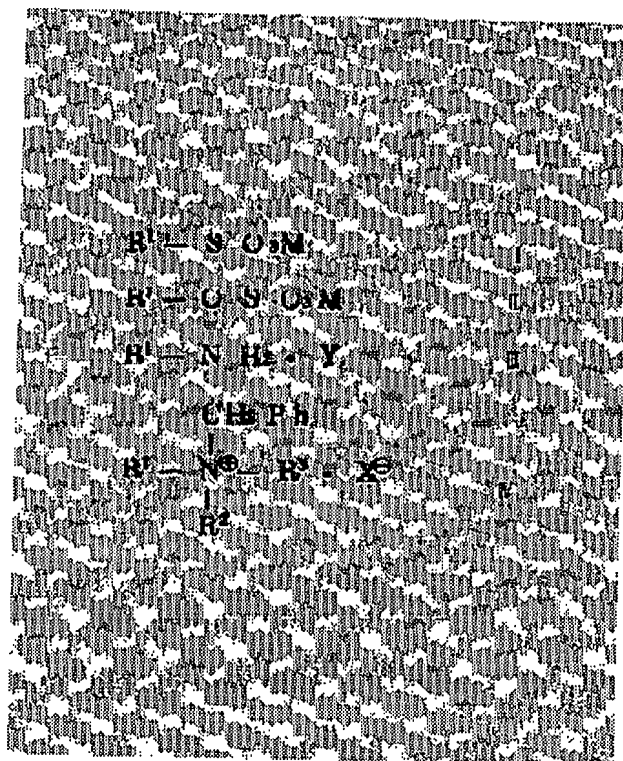
METHOD FOR AVERTING INFLUENCE OF HEMOGLOBIN

Publication number: JP60168050
 Publication date: 1985-08-31
 Inventor: NIIMI YASUMASA; SENDA SHIGEO; MURAMATSU HARUTO; ISA TAKAYUKI; MOGI HIDEAKI
 Applicant: WAKO PURE CHEM IND LTD
 Classification:
 - International: G01N33/49; G01N33/48; G01N33/72; G01N33/49; G01N33/48; G01N33/72; (IPC1-7): G01N33/48
 - European: G01N33/72B
 Application number: JP19840024865 19840210
 Priority number(s): JP19840024865 19840210

Report a data error here

Abstract of JP60168050

PURPOSE: To prevent easily and surely generation of an error in measuring the components to be inspected in a sample blood by adding 1 or ≥ 2 kinds of surface active agents selected from specific 4 kinds to the sample to conjugate instantaneously said agents with hemoglobin thereby eliminating the absorption thereof. **CONSTITUTION:** 1 or ≥ 2 kinds of surface active agents selected from the group expressed by the formulas I, II, III, IV ($R<1>$ is 11-16C alkyl, $R<2>$ is 1-3C alkyl, M is an alkali metal, Y is a mineral or org. acid, X is halogen or inorg. or org. acid residue) are added to a sample blood. Then the hemoglobin in the blood is immediately conjugated by addition of the surface active agents by which the light absorption of the hemoglobin is changed to the absorption without disturbing the absorption of the intended component. Then absorbancy of the intended component in the blood is measured quickly by using such phenomenon and the exact analysis is made possible.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

引用文献 4

⑤ 日本国特許庁(JP)

⑥ 特許出願公開

⑦ 公開特許公報(A)

昭60-168050

⑧ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑨ 公開 昭和60年(1985)8月31日

G 01 N 33/48
33/72B-8305-2G
8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑩ 発明の名称 ヘモグロビンの影響回避方法

⑪ 特 願 昭59-24865

⑫ 出 願 昭59(1984)2月10日

⑬ 発 明 者	新 見	康 正	東京都板橋区成増3-1-7-307 成増アーバンライフ
⑭ 発 明 者	千 田	繁 雄	川越市の橋1267-3
⑮ 発 明 者	村 松	春 人	川越市新宿町3-15-8
⑯ 発 明 者	伊 佐	隆 幸	東京都豊島区目白5-21-4 五色コーポ201号
⑰ 発 明 者	茂 木	秀 明	三鷹市深大寺4024
⑱ 出 願 人	和光純薬工業株式会社 大阪市東区道修町3丁目10番地		

明 細 書

1. 発明の名称

ヘモグロビンの影響回避方法

2. 特許請求の範囲

(1) ヘモグロビンの吸収又はその吸収の経時的変動が臨床化学分析に与える正負の誤差を回避する目的で、試液中に下記一般式①、②、③、④から成る群より選ばれた一種又は二種以上の界面活性剤を添加することを特徴とする臨床化学分析方法。

① $R^1 - S O_3 M$ ② $R^1 - O S O_3 M$ ③ $R^1 - N H_2 \cdot Y$

$$\textcircled{4} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{Ph} \\ | \\ R^1 - N^+ - R^2 \cdot X^- \\ | \\ R^2 \end{array}$$

式中、 R^1 は炭素数11～15のアルキル基、 R^2 、 R^3 は炭素数1～3のアルキル基、 M はアルカリ金属、 Y は硫酸又は有機酸、 X はハロゲン又は無機酸、有機酸の残基、を意味す。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、臨床化学分析に於けるヘモグロビンの影響回避方法に関する。

更に詳しくは、ヘモグロビンの吸収又はその吸収の経時的変動に伴う正負の誤差を回避するため、特定の界面活性剤を用いることを特徴とする、ヘモグロビンの影響回避方法に関する。

近年、臨床化学分析に於ける技術の進歩は著しく、自動分析機の発達と共に、ソフト面での技術開発も盛んに行なわれている。特に、最近では目的物のみならず、測定対象物に対し正負の誤差を与える血清中の共存物質の除去方法についての研究も盛んである。例えば、ビリルビンの影響を回避する方法としては、過ヨウ素酸消去法、ビリルビンオキシダーゼ酸化法等が開発されており、L-アスコルビン酸については、ヨウ素酸酸化法、L-アスコルビン酸オキシダーゼ酸化法等が、また、ヘモグロビンから鉄の遊離を抑える目的には、イミダゾールを始めとする含窒素化合物の添加法等が開発されている。しかしながら、ヘモグロビンの吸光度及びその吸収の経時的変動が、目的物の

測定に対して正負の誤差を与えることに対する回避技術はこれまで習知に近かった。このようなヘモグロビンの影響は、従来の測定方法、即ち、分析する際に本機とは別に検体盲検専用のチャンネルを設け、別個に測定した検体盲検を本検値より差し引くという方法をとっていたことは、それほど問題にはならなかった。ところが、分析機器の発達に伴い、例えば、試料と、発色成分の1部を含むか、又は発色成分を全く含まない第1試液との混合溶液の吸光度を初めに測定し(第1点の吸光度)、次いで、残りの発色成分、又は全発色成分を含む第2試液を添加して、目的成分を発色させ、再度吸光度を測定し(第2点の吸光度)、第1点の吸光度を最終液量に換算して、第2点測定の吸光度より差し引き、盲検チャンネルを使用せずに検体盲検をより高精度にキャンセルする機構(この機構を以後、2点測定法と略称する。)が開発されるようになると、新たに、ヘモグロビンの影響が大きな問題となってきた。即ち、ヘモグロビンに関しては、液性、試薬組成、反応条件に

特開昭60-168050(2)

より、その吸光度が経時的に減少(まれに増加)し、第1点目の吸光度に比べ、2点目の吸光度にはヘモグロビンの吸光度の減少による測定値の低下が顕著に現われ、2点測定法の機能を備えた装置では、その演算機構により記録された第1点目の吸光度を液量換算して、第2点目の吸光度より差し引くため、2波長測光に於ける主波長、あるいは1波長測光に於ける測定波長が、ヘモグロビンの吸収帯(340~600 nm)のより高い吸光度位置にある場合は、通常、目的物の測定に負の影響を、また、2波長測光の副波長がヘモグロビンの吸収帯のより低い吸光度位置にある場合は、正の誤差を与えてしまうことがしばしばあった。

従って、この2点測定法では、第1点の吸光度測定から第2点の吸光度測定までのあいだに、測定対象物の吸収以外の妨害物質の吸収が変化しないことが、より高精度な盲検補正の絶対条件であり、かかる目的に達う、すぐれたヘモグロビンの影響回避方法の出現が要求されていた。

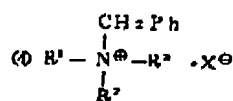
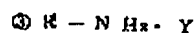
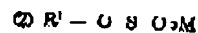
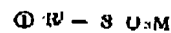
最近、血液中のヘモグロビンを測定するにあつ

り、そのヘモグロビンの吸収を固定することを目的として、脂防族高級スルホン酸塩を用いる方法が特許出願(特開昭56-120981号)されている。しかしながら、このスルホン酸塩を、ヘモグロビン以外の目的対象物を測定する際のヘモグロビンの影響回避のために、その測定系に用いるということはこれまでに全くなされておらず、このスルホン酸塩が目的物の測定に影響を与えずに、ヘモグロビンの吸収を固定することができるかどうかは全く不明であった。

本発明者らは、ヘモグロビンの影響回避方法について鋭意研究の結果、すでに公知になっている脂防族高級スルホン酸及びその塩以外にも、C₁₁~C₁₆のアルキル基を持つ硫黄エステル、C₁₁~C₁₆の1級アミン及びその塩類、並びに第4級アンモニウム塩類の1部にも、ヘモグロビンの吸収固定作用があることを見出し、且つ、脂防族高級スルホン酸及びその塩類を含めたこれら特定の界面活性剤の内の1種又は2種以上のものを、ヘモグロビンの妨害をうける目的物の測定の際に、試薬安

定性や溶解性を考慮して、適宜選択して第1試液に添加すれば、目的物の測定に影響を与えず、ほぼ瞬間的にヘモグロビンと結合し、その吸収を固定して経時的変動を抑え、目的物の測定に対し、ヘモグロビンによる正負の誤差をほぼ完全に回避できることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、ヘモグロビンの吸収又はその吸収の経時的変動が、臨床化学分析に与える正負の誤差を同視する目的で、試液中に下記一般式①、②、③、④から成る併より選ばれた一種又は二種以上の界面活性剤を添加することを特徴とする臨床化学分析方法である。



式中、R¹は炭素数11~16のアルキル基、R²、R³は炭素数1~3のアルキル基、Mはアルカリ

金属、Yは鹼置又は有機酸、Xはハロゲン又は無機酸、有機酸の残基、を表わす。

上記式中、R¹で表わされる炭素数11~16のアルキル基としては、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基が挙げられ、R²、R³で表わされる炭素数1~3のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基が挙げられ、Mで表わされるアルカリ金属イオンとしては、ナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン等が挙げられ、Yとしては、塩酸、硫酸等の酸置、又は酢酸等の有機酸、Xとしては、塩素、臭素、ヨウ素等のハロゲン、又はHSO₃⁻等の無機酸残基、又はCH₂COO⁻等の有機酸残基が夫々挙げられる。

本発明の方法によれば、オキシヘモグロビンの吸収は同時に破壊されてシアノメトヘモグロビンに類似の吸収に変わる為、ヘモグロビンの妨害を受ける恐れのある測定対象物の測定に於て、ヘモグロビンの吸収及びその吸収の経時的変動によって生ずる測定誤差を回避でき、しかも目的物の測

特開昭60-168050(3)

定には何ら影響を与えず、より正確な測定値が得られる。

第1図に、ヘモグロビンの吸収曲線(a)、及びヘモグロビンに本発明に係る界面活性剤を添加した場合の吸収曲線(b)、並びにシアノメトヘモグロビンの吸収曲線(c)を示す。即ち、第1図に於て、(a)はヘモグロビン溶液(19g/dl)20mlにpH=8.3の0.01M酢酸ソーダ溶液5.0mlを添加した場合、(b)は同ヘモグロビン溶液に0.5%のラウリル硫酸ソーダを含むpH=8.3の0.01M酢酸ソーダ溶液5.0mlを添加した場合、(c)は同じく、ドラブヤン試液(KCN0.005%, フェリシアン化カリウム0.02%, 重炭酸ナトリウム0.1%)5.0mlを添加した場合、に於ける夫々の吸収曲線を示している。第1図から明らかな如く、ヘモグロビンに本発明に係る特定の界面活性剤であるラウリル硫酸ソーダ(LDB)を添加すると、同時にオキシヘモグロビンの吸収(a)が破壊され、シアノメトヘモグロビン(c)に類似の吸収(b)に変わる。

本発明に係る界面活性剤とヘモグロビンの結合

体の吸収は、界面活性剤の種類により多少異なるが、いずれも第1図の吸収曲線とはほぼ同様な結果が得られる。尚、ラウリル硫酸ソーダのこれらの作用については既に公知であり、血液中のヘモグロビンの測定に利用されているが、本発明のようて、この作用をヘモグロビン以外の物質の測定時に、ヘモグロビンの妨害を防ぐ目的で利用したものは、これまでに全くなく、本発明者らが初めてである。

表1に、本発明に係る各種界面活性剤とこれらを添加した場合のヘモグロビンの吸収変動の関係を示す。

表中、例えば0.160は、ヘモグロビンの吸収が当初のものより0.160低下することを示しており、本発明に係る特定の界面活性剤を添加した場合には、始めは大きく低下し、そのあとの低下は少ないが、無添加の場合には、4~8分後に於ても相当量の低下が見られる。即ち、本発明に係る特定の界面活性剤を添加した場合には極めて短時間の内にヘモグロビンが固定化されて、以後は殆

んど変化しなくなるが、無添加の場合にはいつまでも変化し続けていることが判る。

以下余白



〔試薬〕

①第1試液

カフェイン	2.5 %
安息香酸ソーダ	3.8 %
酢酸ソーダ	6.3 %
B D T A - 4Na	0.1 %
Brij - 35 (花王アトラス牌商品名)	0.2 %
ラウリル硫酸ソーダ	0.5 %

②第2試液

スルファニル酸	0.1 %
塩酸	0.1 N

これらを、使用時に 0.2 名の重硝酸ソーダ溶液と 10 : 1 に混合する。

〔測定方法〕

日立製作所自動分析機 736 機を使用。

試料 10 ml に第1試液 400 μ l を加え、37℃に 3.2 分 (192 秒) 放置して、 $\lambda_2 = 546 \text{ nm}$ 、 $\lambda_1 = 600 \text{ nm}$ の 2 波長で吸光度を測定した後、第2試液 100 μ l を添加して、37℃で 4 分間反応し、 $\lambda_2 = 546 \text{ nm}$ 、 $\lambda_1 = 600 \text{ nm}$ の 2 波長で吸

特開昭60-168050 (5)

光度を測定する。第1点の吸光度差 (B_1) を $\frac{410}{510}$ 倍して第2点吸光度差 (B_2) から差し引き、同様の操作で得た標準の吸光度より、試料中のビリルビン濃度を算出する。

比較例 1.

〔試料〕

実施例 1. に同じ。

〔試薬〕

①第1試液

実施例 1. の第1試液からラウリル硫酸ソーダを除いたもの。

②第2試液

実施例 1. に同じ。

〔測定方法〕

実施例 1. に同じ。

実施例 1. 及び比較例 1. の総ビリルビン濃度の測定結果を表 2 に示す。

表 2

測定方法 試料中の ヘモグロビンの濃度	実施例 1. ラウリル硫酸ナトリウム 0.5 名含有	比較例 1. ラウリル硫酸ナトリウム を含まない
0 mg/dl	0.5 mg/dl	0.5 mg/dl
50	0.5	0.3
100	0.4	0.0
150	0.4	-0.3
200	0.4	-0.6
250	0.4	-1.0
300	0.4	-1.2
350	0.3	-1.5
400	0.4	-1.7
450	0.4	-2.0
500	0.3	-2.4
700	0.3	-3.4
1000	0.3	-4.9

表 2 より明らかな如く、本発明の方法、即ちラウリル硫酸ナトリウムを添加した場合には、ヘモグロビンがかなりの量混入していても、測定値に

さほどの影響は認められないが、ラウリル硫酸ナトリウムを添加しない場合には、ヘモグロビンによる負の偏差が極めて大きく、ヘモグロビンの値によっては、測定値がマイナスの値をとる。

また、実施例 1. 及び比較例 1. に於て、ヘモグロビン濃度 (mg/dl) 0 (1) 及び (1'), 500 (2) 及び (2'), 1000 (3) 及び (3') の場合の各々の反応タイムコースを、夫々第 2 図及び第 3 図に示す。

即ち、第 3 図では、添加したヘモグロビンが徐々に退色し、第 1 測定点で得た検体盲検値から液抜換算した理論盲検値を、第 2 測定点の吸光度 B_2 より差し引くと負の値となり、大幅な負偏差となるのに対し、第 2 図に示す如く、ラウリル硫酸ナトリウムを 0.5 名添加した試薬を使用した場合には、第 1 試液を混合後、1 分以内に吸光度は安定し、第 1 測定点と第 2 測定点のあいだのヘモグロビンの吸光度変化が殆んどなくなり、正確な測定結果が得られることがわかる。

このように、ビリルビンの測定に於て、本発明

に係る特定の界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウムを添加することにより、容易に且つ効果的にヘモグロビンの影響を回避できる。

実施例2 総ビリルビンの測定（塩化ベンザルコニウム使用）

〔試薬〕

①第1試液

カフェイン	2.5%
安息香酸ソーダ	3.8%
酢酸ソーダ	6.3%
B D T A - 4 Na	0.1%
B r i l - 3 5	0.2%
塩化ベンザルコニウム	0.2%

②第2試液

スルファニル酸	0.1%
塩酸	0.1N

これらを、使用時に0.2%の硝酸銀ソーダ溶液と10:1に混合する。

〔測定方法〕

日本電子クリナライザーVX-1000を使用。

実施例3に同じ。

〔試薬〕

第1試液として、実施例3の第1試液から塩化ベンザルコニウムを除いたものを用いる。第2試液は実施例3に同じ。

〔測定方法〕

実施例3に同じ。

実施例3及び比較例2の総ビリルビン濃度の測定結果を表3に示す。

表 3

測定方法 試料中 ヘモグロビンの濃度	実施例3. 塩化ベンザルコニウム 0.2%含有	比較例2. 塩化ベンザルコニウム を含まない
0mg/dl	0.96mg/dl	0.84mg/dl
50	1.02	0.77
100	1.02	0.71
150	1.04	0.61
200	1.04	0.47
250	1.16	0.36
300	1.22	0.26
350	1.19	0.04
400	1.23	-0.13
450	1.23	-0.27
500	1.19	-0.42

特開昭60-168050(6)

試料15μlに第1試液400μlを加え、これを水165μlで反応管に希釈し、37℃に25分放置して、第1点吸光度(B₁)を540nmで測定した後、第2試液100μlを水100μlで押し出し、37℃で2.3分放置した後、第2点吸光度(B₂)を540nmで測定する。第1点吸光度(B₁)を $\frac{580}{780}$ 倍して、第2点吸光度(B₂)より差し引き、同様の操作で得た標準の吸光度より、試料中のビリルビン濃度を算出する。

本実施例における検量線を第4図に示す。

実施例3 総ビリルビンの測定（塩化ベンザルコニウム使用）

〔試薬〕

実施例2に同じ。

〔測定方法〕

試料溶液として、人血清中に各種濃度のヘモグロビンを添加したものを各15μl用いる。以下の測定方法は実施例2に同じ。

比較例2

〔試料〕

表3より明らかな如く、ビリルビンの測定に於て、本発明に係る特定の界面活性剤である塩化ベンザルコニウムを添加することにより、ヘモグロビンの負誤差が大幅に改善されていることがわかる。

実施例4 総ビリルビンの測定（同時再現性）

試料としてブール血清及び高価ブール血清を使用し、実施例2と同じ試薬（塩化ベンザルコニウム使用）を用い、実施例2と同じ測定方法（日本電子クリナライザーVX-1000使用）により繰り返し総ビリルビンの測定を行う。結果を表4に示す。

以下全頁



表 4

No	ブール血清	高価ブール血清	No	ブール血清	高価ブール血清
1	1.39 mg/dl	5.56 mg/dl	18	1.42 mg/dl	5.72 mg/dl
2	1.40	5.52	19	1.41	5.60
3	1.40	5.51	20	1.42	5.68
4	1.35	5.52	21	1.37	5.74
5	1.34	5.58	22	1.43	5.53
6	1.37	5.40	23	1.41	5.54
7	1.40	5.52	24	1.39	5.40
8	1.38	5.54	25	1.44	5.51
9	1.44	5.53	26	1.42	5.54
10	1.40	5.52	27	1.45	5.66
11	1.44	5.61	28	1.41	5.56
12	1.39	5.51	29	1.38	5.58
13	1.36	5.58	30	1.46	5.68
14	1.44	5.55	平均	1.406	5.582
15	1.41	5.41	標準偏差	0.0300	0.0834
16	1.41	5.58	実験係数	2.14%	1.49%
17	1.43	5.63			

特開昭60-168050 (7)

表4より明らかな如く、本測定法は非常にバラツキが少ない。

実施例5. 脂とリルビンの測定(相関)

〔試料〕

人血清30検体使用

〔試薬〕

実施例2に同じ。

〔測定方法〕

実施例2に同じ。

比較例3.

〔試料〕

実施例5と同じ検体(人血清30検体)

〔試薬〕

実施例5の試薬から塩化ベンザルコニウムを除いたもの

〔測定方法〕

実施例5に同じ。

不明の測定方法である実施例5.(塩化ベンザルコニウム使用)と、従来法である比較例3.の相関を表5及び第5図に示す。

表 5

No	実施例5.	比較例3.	No	実施例5.	比較例3.
1	0.35 mg/dl	0.37 mg/dl	16	2.19 mg/dl	1.93 mg/dl
2	0.51	0.61	17	3.18	2.89
3	0.56	0.59	18	5.18	5.11
4	0.44	0.31	19	11.27	11.12
5	0.33	0.30	20	4.41	4.32
6	0.41	0.38	21	3.44	3.48
7	0.69	0.68	22	2.15	2.13
8	0.50	0.47	23	8.87	8.75
9	0.28	0.24	24	12.64	12.50
10	0.71	0.71	25	4.47	4.26
11	0.48	0.48	26	8.20	7.90
12	0.38	0.32	27	1.19	-0.18
13	0.69	0.45	28	1.98	1.83
14	2.89	2.93	29	0.37	0.26
15	2.27	2.19	30	0.47	0.33

* No 27 は脂血試料

表5及び第5図より明らかなように、脂血の含

い検体に於て、本法は従来法と良い相関を示している。 $(Y = 1.011X + 0.0548, r = 0.999)$

4. 脂血の簡単な説明

図1図は、ヘモグロビン溶液(15 g/dl)中に、(a) pH = 8.3 の0.01 M 酢酸ソーダ溶液を添加した場合、(b) 0.5% のラウリル硫酸ソーダを含む pH = 8.3 の0.01 M 酢酸ソーダ溶液を添加した場合、(c) ドラブキオン試液(KCN 0.005%, フェリチン化カリウム 0.02%, 炭酸ナトリウム 0.1%) を添加した場合に於ける夫々の吸収曲線を示し、横軸は吸収波長(nm)を、縦軸は吸光度(OD)を示す。

図2図は、実施例1.に於ける反応タイムコースを示したもので、(1)、(2)、(3)は、夫々ヘモグロビン濃度(mg/dl) 0, 500, 1000の場合の反応タイムコースであり、縦軸は546 nmの吸光度と600 nmの吸光度の吸光度差(UD) $\times 10^4$ を示し、横軸は時間(秒)を示す。また、 B_1 は第1試薬添加点、 B_2 は第1測定点、 B_3 は第2試薬添加点、 B_4 は第2測定点を示し、 $B_2(1)$ 、 $B_2(2)$

$E_2(3)$ は、夫々(1)、(2)、(3)の E_2 点に於ける理論算検値(E_2 に於ける算検値を液量補正したもの)を示している。

第3図は、比較例1に於ける反応タイムコースを示したもので、(1)、(2)、(3)は、夫々ヘモグロビン濃度(μg/dl) 0、500、1000の場合の反応タイムコースであり、縦軸は548nmの吸光度と600nmの吸光度の吸光度差(OD) $\times 10^4$ を示し、横軸は時間(秒)を要す。また、 R_1 は第1試薬添加点、 E_1 は第1測定点、 R_2 は第2試薬添加点、 E_2 は第2測定点を示し、 $E_2(1)$ 、 $E_2(2)$ 、 $E_2(3)$ は、夫々(1)、(2)、(3)の E_2 点に於ける理論算検値(E_2 に於ける算検値を液量補正したもの)を示している。

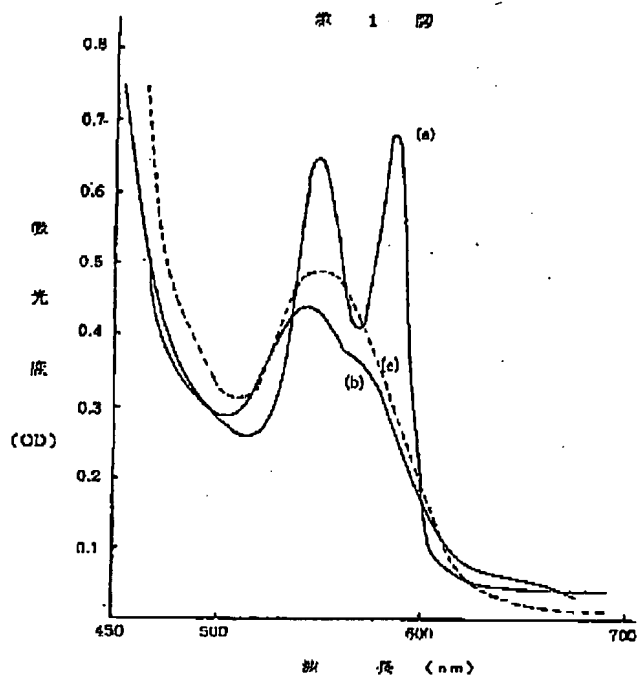
第4図は、実施例2に於ける検量線を示し、横軸はビリルビン濃度の希釈度を、縦軸はビリルビン濃度(μg/dl)を要す。

第5図は、本発明の方法である実施例5。(塩化ベンザルコニウム使用)と従来法である比較例3。(塩化ベンザルコニウム使用せず)との相関を示

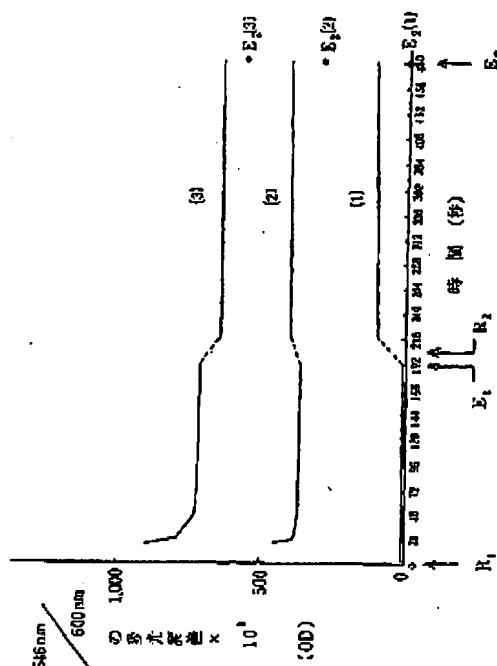
特開昭60-168050(B)

したもので、縦軸 Y は本法に於けるビリルビン測定値(μg/dl)を、横軸 X は従来法に於けるビリルビン測定値(μg/dl)を要す。

特許出願人 和光純薬工業株式会社



第 2 図



特開昭60-168050 (9)

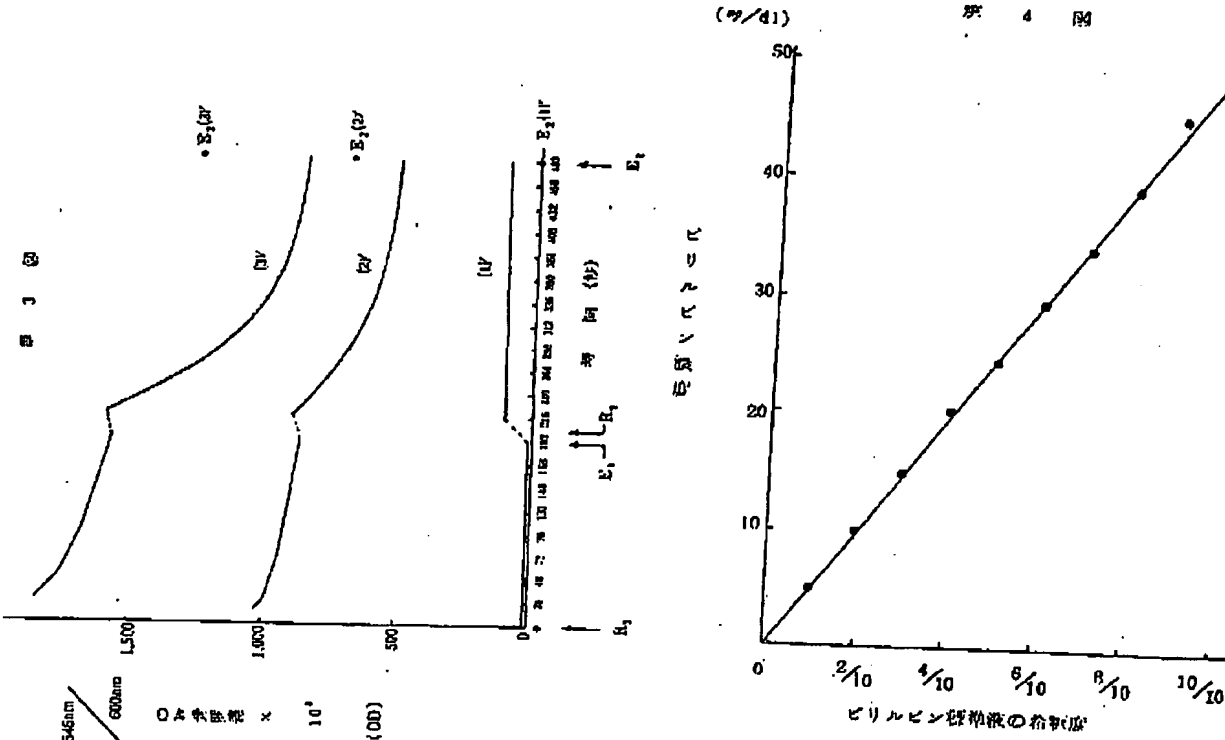
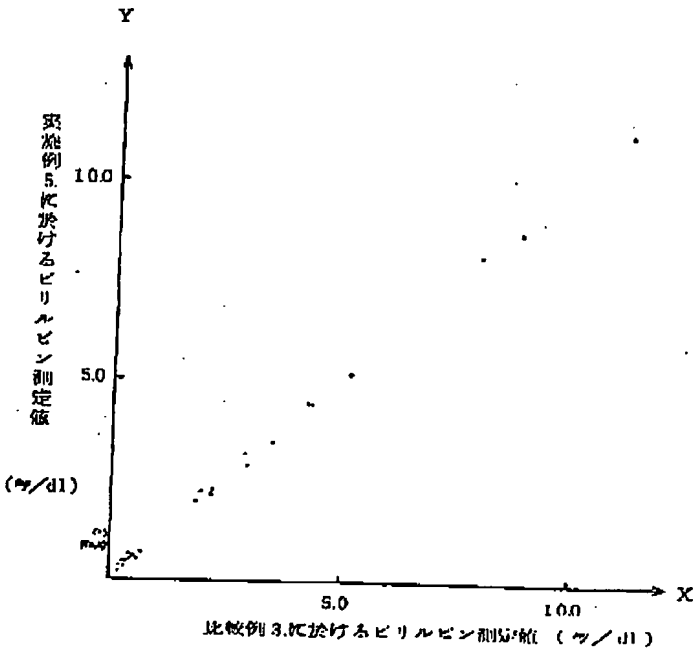


図 5



特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 昭和 59 年特許願第 24865 号 (特開昭
 60-168050 号, 昭和 60 年 8 月 31 日
 発行 公開特許公報 60-1681 号掲載) につ
 いては特許法第17条の2の規定による補正があっ
 たので下記のとおり掲載する。 6 (1)

Int. Cl. ⁵	識別 記号	庁内整理番号
G01N 33/48 33/72		B-7055-2G 7055-2G

平成 3. 5. 29 発行

手続補正書

平成 3 年 1 月 31 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 59 年特許願第 24865 号

2. 発明の名称

ヘモグロビンの影響回遊方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市中央区道徳町三丁目1番2号

「平成元年2年13日住所表示変更」

名称 和光純薬工業株式会社

代表者 田中 幹 晃

4. 代理人

住所 東京都中央区日本橋本町4丁目5番13号

和光純薬工業株式会社 東京支店內

氏名 (8078) 井原士 平井順二

連絡先 特許課(東京)TEL03-3270-9145

5. 補正命令の日付

自 発

3. 5. 1 }

6. 補正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄。

7. 補正の内容

(1) 明細書25頁4行目から5行目にかけて記載の
 「(15g/dl) 中に、」を「(15g/dl) 20ml中に、
 」と補正する。

(2) 明細書25頁9行目から10行目にかけて記載
 の「炭酸ナトリウム 0.1%」を添加した場合」
 を「重炭酸ナトリウム 0.1%」を天々5.0ml添加
 した場合」と補正する。

以上

-(39) -1-

引用文献 /

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年4月4日 (04.04.2002)

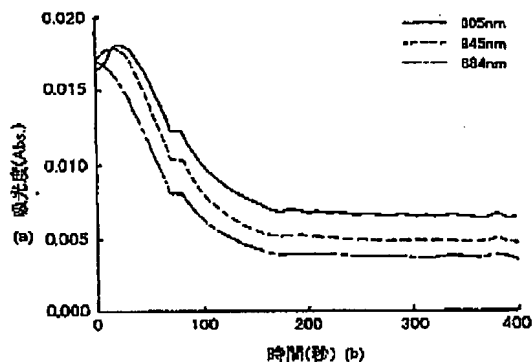
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/27331 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/72, 21/78
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08484
(22) 国際出願日: 2001年9月27日 (27.09.2001)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2000-296538 2000年9月28日 (28.09.2000) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アーク
レイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京
都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
(72) 発明者: および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平井 香 (HIRAI,
Kaoru) [JP/JP]. 小森風樹 (KOMORI, Tsugaki) [JP/JP];
〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地
アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
(74) 代理人: 特許業務法人 地内・佐藤アンドパートナーズ
(IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTOR-
NEYS); 〒530-6026 大阪府大阪市北区西天満1丁目8
番30号 OAPタワー26階 Osaka (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
[続編有])

(54) Title: ASSAY METHOD WITH THE USE OF REDOX REACTION

(54) 発明の名称: 酸化還元反応を用いた測定方法



(a)...ABSORBANCE (Abs.)

(b)...TIME (SEC)

(57) Abstract: A method of assaying a subject to be assayed in a sample with the use of a redox reaction whereby highly reliable data can be obtained. Prior to the above-described redox reaction, a tetrazolium compound is added to the sample in the presence of a surfactant so as to eliminate the effects as reducing agents of hemoglobin and hemoglobin decomposition products contained in the sample. Next, a reduced or oxidized product originating in the above-described subject to be assayed is generated and its amount is measured by the redox reaction. Thus, the amount of the subject to be assayed is determined based on the value thus measured. According to this method, cloudiness due to the coexistence of the surfactant and hemoglobin can be regulated and thus an increase in the absorbance assignable to the cloudiness can be inhibited, as Fig. 1 shows. As the above described surfactant, use can be made of polyoxyethylene ether, etc.

[続編有]

WO 02/27331 A1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640 2641 2642 2643 2644 2645 2646 2647 2648 2649 2650 2651 2652 2653 2654 2655 2656 2657 2658 26

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

明 細 書

酸化還元反応を用いた測定方法

技術分野

本発明は、試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法
5 法に関する。

背景技術

従来から、酸化還元反応を利用して、試料中の測定対象物の量を測定
することは、広く実施されており、例えば、生化学分析や臨床検査等に
10 おける糖化タンパク質の測定にも適用されている。

例えば、血液中の糖化タンパク質、特に赤血球中の糖化ヘモグロビン
は、生体血糖値の過去の履歴を反映しているため、糖尿病診断や治療等
における重要な指標とされている。このような赤血球中の糖化タンパク
質は、前記酸化還元反応を用いて、例えば、以下に示すようにして測定
15 されている。

まず、赤血球を溶血させた試料を調製し、この溶血試料をフルクトシル
アミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）で処理し、糖化
タンパク質の糖化部分に作用させて過酸化水素を発生させる。この過酸
化水素量は、前記糖化タンパク質量に対応する。そして、この試料に、
20 ペルオキシダーゼ（以下、「POD」という）および還元剤を添加し、
前記PODを触媒として前記過酸化水素と前記還元剤との間で酸化還元
反応させる。この時、前記還元剤として、酸化されることにより発色す
る発色性基質を用いれば、その発色の測定により前記過酸化水素量を測
定でき、この結果、赤血球中の糖化タンパク質量を知ることができる。

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

しかし、血液中には、通常、アスコルビン酸（AsA）、ビリルビン等の各種還元物質が存在し、赤血球中には、さらに、グルタチオン（GSH）等の各種還元物質が存在する。これらの還元物質により、例えば、発生させた前記過酸化水素が還元されたり、前記酸化還元反応が阻害されたり、前記発色性基質が酸化により発色しても、再度還元され退色するおそれがある。このため、赤血球中の糖化タンパク質量を正確に測定することが困難であるという問題があった。

また、試料ごとによって、含まれる前記還元物質の濃度も一定ではないため、測定精度が劣るという問題もあった。

このような問題を回避するために、例えば、種々の酸化剤を前記試料に添加するという方法がある。例えば、特開昭56-151358号公報には、酸化剤としてヨウ素酸や過ヨウ素酸等のハロゲン酸化物を用いる方法が開示されており、特開昭57-13357号公報、特開昭57-161650号公報、特開昭59-193354号公報、特開昭62-169053号公報、特開平3-30697号公報には、酸化剤としてコバルト、鉄、セリウム等の金属錯体を用いる方法が開示されている。

発明の開示

しかしながら、このように改良された従来の方法でも、試料によっては測定精度が十分に向上しない場合もある。また、前述のように、血液中の糖化タンパク質は、糖尿病診断や治療等における重要な指標とされているため、これを測定するための酸化還元反応を用いた測定方法においても、更なる測定精度の向上が望まれている。

そこで、本発明の目的は、試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法であって、信頼性に優れる測定値が得られる測定方法

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

の提供である。

前記目的を達成するために、本発明の測定方法は、試料中の測定対象物を酸化還元反応を用いて測定する方法であって、前記酸化還元反応に先立ち、界面活性剤の存在下、試料にテトラゾリウム化合物を添加して

5 前記試料中の還元物質の影響を排除し、その後、前記測定対象物由来の還元物質または酸化物質の量を酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定することを特徴とする。前記テトラゾリウム化合物とは、テトラゾール環構造を有する化合物である。なお、本発明において、「測定対象物由来の還元物質または酸化物質」とは、測定対象物そのもの、もしくは、その中の酸化還元物質、または測定対象物から酸化還元酵素等を用いて発生した酸化還元物質の双方を意味する

10

本発明者らは、前記従来の方法では、前記GSHやAsAのような低分子量還元物質の影響は排除されるが、タンパク質等のような高分子量還元物質による影響が排除されておらず、一方、前記テトラゾリウム化合物で処理すれば、前記低分子量還元物質だけでなく、前記高分子量還元物質、特にヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物（以下、両者あわせて「ヘモグロビン」という）の還元物質としての影響を排除できることを見出した。なお、これについて、本出願人は別途出願している（特

15 開2000-210100号公報）。しかしながら、この方法では、例えば、ヘモグロビン等の高分子量還元物質による影響も排除されたにもかかわらず、十分に測定精度が向上しないこと、また、よりいっそうの測定精度の向上が望まれていることから、本発明者らは、さらに鋭意研究を行った。その結果、前記テトラゾリウム化合物の処理によって、例

20 えば、ヘモグロビン等の高分子量還元物質による影響は排除できるが、前記両者を混在させることにより、反応液に濁りが生じることを突き止

25

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

め、さらに、この濁りの発生を界面活性剤によれば防止できることを見出し、本発明に到達した。このような本発明の測定方法によれば、テトラソリウム化合物によって還元物質の影響を排除し、かつ、前記テトラソリウム化合物処理による濁りの発生も抑制するため、還元物質および濁りの両方による測定妨害を防止でき、よりいっそう高精度な測定が可能となる。このため、本発明の測定方法は、前述のような臨床医療等における各種検査に有用であり、特に糖化ヘモグロビンの測定に適用すれば、糖尿病診断等の指標としての信頼性も向上する。

本発明の測定方法において、前記試料がヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物を含む試料であって、前記試料中のヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の還元物質としての影響を排除することが好ましい。特に、試料中のヘモグロビンの還元物質としての影響を排除し、かつ前記両者による濁りも排除できるからである。したがって、後述のような血液試料について有用な測定であるといえる。

本発明の測定方法において、試料にテトラソリウム化合物を添加してから、濁りが発生した混合液にさらに界面活性剤を添加してもよいが、濁りの発生自体を抑制できることから、前記両者を同時に添加したり、予め界面活性剤を添加した試料にテトラソリウム化合物を添加することが好ましい。

本発明の測定方法において、前記酸化還元反応による測定が、前記反応により生じた発色物質の吸光度測定であることが好ましい。

前記吸光度測定を行う場合、通常、二波長測定が主流である。前記二波長測定は、例えば、測定する対象物（例えば、発色性基質等の発色物質）の極大吸収を示す波長を主波長として前記対象物を測定し、さらに前記主波長と異なる波長を副波長とし、電氣的ノイズ、試料の濁り、光量の変化等を測定して、前記主波長における測定値を校正する。したが

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

つて、副波長は、例えば、他の混在する物質が吸収を示さない波長であり、かつ、主波長とは約80 nm以上離して設定することが好ましい。そこで、本発明者らはさらに研究を重ねた結果、界面活性剤非存在下でHbをテトラゾリウム化合物処理すると、これらの反応物により約700~900 nm、特に約760 nm~900 nmの波長に吸収が見られるようになり、この波長での測定が困難であるが、界面活性剤存在下でテトラゾリウム化合物処理すれば、前記波長では吸収が見られないことを見出した。したがって、この約700 nm~900 nmの吸収波長に、前記発色物質の測定波長（主波長や副波長）を設定すれば、前記濁りを防止することだけでなく、さらにHbの吸収による影響を受けることなく、吸光度測定を精度よく行うことができる。

本発明の測定方法において、前記発色物質の吸光度測定の測定波長としては、650~900 nmの範囲が好ましく、より好ましくは650~800 nmの範囲であり、特に好ましくは、690~760 nmの範囲である。また、前記波長を主波長とする場合、副波長は、前記主波長よりも大きいことが好ましく、例えば、730~900 nmの範囲が好ましく、より好ましくは800~900 nmの範囲であり、特に好ましくは、800~850 nmの範囲である。

本発明の測定方法において、前記界面活性剤が、非イオン性界面活性剤、アルキル硫酸塩および高分子化合物からなる群から選択された少なくとも一つの界面活性剤であることが好ましい。

前記非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンエーテル、ソルピタン脂肪酸エステル等があげられ、好ましくは、ポリオキシエチレンエーテルである。

25 前記ポリオキシエチレンエーテル $[C_L H_M - O - (CH_2 CH_2 O)_N H]$ は、ポリオキシエチレン鎖と炭化水素鎖とがエーテル結合してお

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

り、前記炭化水素鎖としては、例えば、アルキル基、アルキルフェニル基等があげられる。前記ポリオキシエチレン鎖の重量平均重合度 (N) は 8 ~ 23 の範囲であり、他方の炭化水素鎖の炭素数 (L) は 8 ~ 18 の範囲であることが好ましく、より好ましくは前記重量平均重合度 (N) が 8 ~ 15 の範囲であり、炭化水素鎖の炭素数 (L) が 8 ~ 16 の範囲であり、特に好ましくは前記重量平均重合度 (N) が 8 ~ 10 の範囲であり、炭化水素鎖の炭素数 (L) が 8 ~ 14 の範囲である。また、前記炭化水素鎖は、例えば、直鎖でもよく、分岐鎖を有していてもよい。前記ポリオキシエチレンエーテルの具体例としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-tert-オクチルフェニルエーテル、ポリエチレングリコール (10) ラウリルエーテル、ポリエチレングリコール (9) ラウリルエーテル等があげられる。

前記ソルビタン脂肪酸エステルとしては、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル等があげられる。

前記アルキル硫酸塩としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウム、2, 4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウム等があげられる。

前記高分子化合物としては、例えば、水溶性ゼラチン、プルラン等の生体高分子化合物や、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン等の合成高分子化合物が使用できる。ポリエチレングリコールの重量平均重合度は、例えば、100 ~ 30,000 の範囲であり、好ましくは 600 ~ 6000 の範囲である。プルランとは、多糖類であり、マルトリオース残基が α 1-6 結合で連なった水溶性 α -グルカンをいう。

本発明の測定方法は、前記界面活性剤を、試料 1 mL あたり 0.05 ~ 5 mmol の範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは 0.1 ~ 3 mmol の範囲であり、より好ましくは 0.2 ~ 1.5

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

mmolの範囲である。また、前記界面活性剤を、テトラゾリウム化合物1molあたり0.2～15molの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.5～10molの範囲であり、より好ましくは0.7～5molの範囲である。

- 5 本発明の測定方法において使用する前記テトラゾリウム化合物としては、例えば、テトラゾール環の少なくとも2箇所に環構造置換基を有することが好ましく、より好ましくは、3箇所に環構造置換基を有する構造である。

- 10 前記テトラゾリウム化合物が、前述のように、前記テトラゾール環の少なくとも2箇所に環構造置換基を有する場合、前記置換基を、前記テトラゾール環の2位および3位に有することが好ましい。また、テトラゾリウム化合物が3箇所に環構造置換基を有する場合は、前記置換基を、前記テトラゾール環の2位、3位および5位に有することが好ましい。

- 15 また、少なくとも2つの環構造置換基の環構造がベンゼン環であることが好ましい。また、ベンゼン環以外の環構造置換基としては、例えば、環骨格にSまたはOを含み、かつ共鳴構造である置換基があげられ、例えば、チエニル基、チアゾイル基等である。

- 20 前記テトラゾリウム化合物が、テトラゾール環の少なくとも3箇所に環構造置換基を有し、前記環構造置換基のうち少なくとも2つの環構造置換基の環構造がベンゼン環であることが好ましい。

少なくとも1つの環構造置換基が官能基を有することが好ましく、前記官能基の数が多いたことがより好ましい。

- 25 前記官能基としては、電子吸引性の官能基が好ましく、例えば、ハロゲン基、エーテル基、エステル基、カルボキシ基、アシル基、ニトロソ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基等があげられる。この他にも、

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

例えば、ヒドロペルオキシ基、オキシ基、エポキシ基、エピジオキシ基、オキソ基等の酸素を含む特性基や、メルカプト基、アルキルチオ基、メチルチオメチル基、チオキソ基、スルフィノ基、ベンゼンスルホニル基、フェニルスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、p-トリルスルホニル基、トシル基、スルファモイル基、イソチオシアネート基等の硫黄を含む特性基等があげられる。これらの電子吸引性官能基の中でも、好ましくは、ニトロ基、スルホ基、ハロゲン基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基である。また、前記電子吸引性の官能基の他に、例えば、フェニル基 (C_6H_5-)、スチリル基 ($C_6H_5CH=CH-$) 等の不飽和炭化水素基等もあげられる。なお、前記官能基は、解離によりイオン化していてもよい。

前記テトラゾリウム化合物は、テトラゾール環の2位および3位にベンゼン環を有し、前記ベンゼン環のうち少なくとも一方が、ハロゲン基、カルボキシ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選択された少なくとも1つの官能基を有することが好ましい。なお、前記両方のベンゼン環が、前記官能基を有してもよい。前記ベンゼン環において、いずれの箇所 (ortho-, meta-, para-) に前記官能基を有してもよい。また、官能基の数も特に制限されず、同じ官能基を有しても、異なる官能基を有してもよい。

前記テトラゾリウム化合物は、例えば、前記テトラゾール環の2位、3位および5位にベンゼン環構造置換基を有する化合物として、例えば、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフ

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

エニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-(1,1'-ビフェニル-4,4'-ジル)-ビス(2,5-ジフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩]、2,3-ジフェニル-5-(4-クロロフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(p-ジフェニル)テトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-(p-ジフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(4-スチリルフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(m-トリル)テトラゾリウム塩および2,5-ジフェニル-3-(p-トリル)テトラゾリウム塩等があげられる。

10 また、前記テトラゾリウム化合物は、前述のような化合物には制限されず、この他に、前記テトラゾール環の2箇所にベンゼン環構造置換基および1箇所にその他の環構造置換基を有する化合物も使用でき、例えば、2,3-ジフェニル-5-(2-チエニル)テトラゾリウム塩、2-ベンゾチアゾイル-3-(4-カルボキシ-2-メトキシフェニル)-5-[4-(2-スルホエチルカルバモイル)フェニル]-2H-テトラゾリウム塩、2,2'-ジベンゾチアゾイル-5,5'-ビス[4-ジ(2-スルホエチル)カルバモイルフェニル]-3,3'-(3,3'-ジメトキシ-4,4'-ビフェニレン)ジテトラゾリウム塩および3-(4,5-ジメチル-2-チアゾイル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム塩等があげられる。

20 また、前記テトラゾール環の2箇所にベンゼン環構造置換基および1箇所に環構造でない置換基を有するテトラゾリウム化合物も使用でき、例えば、2,3-ジフェニル-5-シアノテトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-カルボキシテトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-メチルテトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-エチルテトラゾリウム塩等があげられる。

25 前述のテトラゾリウム化合物の中でも、前述のように、環構造置換基を3つ有する化合物が好ましく、より好ましくは、環構造がベンゼン環

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

である置換基を3つ有し、かつ電子吸引性官能基を多く有するものであり、特に好ましくは、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩である。

5 なお、このようなテトラゾリウム化合物は、例えば、塩でもよいし、イオン化された状態等であってもよい。また、一種類には限られず、二種以上を併用してもよい。

、本発明の測定方法において、前記テトラゾリウム化合物の添加量は、特に制限されず、例えば、試料の種類や前記試料に含まれるヘモグロビンやその他の還元物資の量により適宜決定できる。具体的には、例えば、
10 試料1 μL 当たり、前記テトラゾリウム化合物を、0.001~100 μmol の範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.005~10 μmol の範囲、特に好ましくは、0.01~1 μmol の範囲である。

本発明の測定方法において、前記試料が全血の場合、前記テトラゾリウム化合物を、全血1 μL 当たり、0.001~10 μmol の範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.005~5 μmol の範囲、特に好ましくは0.01~2 μmol の範囲である。なお、全血の血球濃度は、通常、50重量%と推定できる。具体的には、
20 前記テトラゾリウム化合物が2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩の場合は、全血1 μL 当たり、0.02~10 μmol の範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.05~3 μmol の範囲、特に好ましくは0.1~2 μmol の範囲である。

25 なお、前記界面活性剤の添加量は、テトラゾリウム化合物の添加量に応じて、例えば、前述のようなモル比となるように調整できる。

本発明において、前述のような酸化還元反応により生じた発色物質の

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

吸光度測定とは、例えば、酸化還元酵素を用いた前記還元物質または酸化物質と発色性基質との酸化還元反応により、発色した前記発色性基質（すなわち発色物質）の吸光度測定であることが好ましい。

具体的には、前記測定対象物由来の酸化物質が過酸化水素であり、前記発色性基質として酸化により発色する発色性基質を使用し、前記過酸化水素と前記発色性基質とを酸化還元酵素によって酸化還元反応させることが好ましい。

前記酸化還元酵素としては、特に制限されないが、例えば、PODが好ましく、前記酸化により発色する発色性基質としては、高感度に検出可能であることから、例えば、N-（カルボキシメチルアミノカルボニル）-4, 4'-ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミンナトリウムが好ましい。

本発明の測定方法において、前記測定試料は、特に制限されないが、全血、血漿、血清、血球等の血液試料の他に、例えば、尿、髄液、唾液等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等もあげられる。また、血球内成分を測定する場合は、例えば、全血をそのまま溶血させたものを試料としてもよいし、全血から赤血球を分離して、前記赤血球を溶血させたものを試料として用いてもよい。

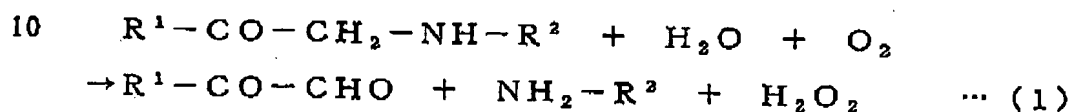
本発明の測定方法において、前記測定対象物は、前記酸化還元反応を利用するものであれば特に制限されないが、例えば、全血中成分、赤血球内成分、血漿中成分、血清中成分等もがあげられ、好ましくは赤血球内成分である。また、具体的には、例えば、糖化ヘモグロビンや糖化アルブミン等の糖化タンパク質、糖化ペプチド、糖化アミノ酸、グルコース、尿酸、コレステロール、クレアチニン、サルコシン、グリセロール等があげられ、より好ましくは糖化タンパク質であり、特に好ましくは糖化ヘモグロビンである。

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

本発明の測定方法において、測定対象物が糖化タンパク質の場合、前記糖化タンパク質の糖化部分をFAODで酸化分解することにより過酸化水素を生成させることが好ましい。また、測定対象物が前記糖化ペプチド、糖化アミノ酸の場合も、同様にFAODを作用させることが好ましい。なお、前記糖化タンパク質や糖化ペプチドは、必要に応じて、前記FAOD処理前に、プロテアーゼ処理することが好ましい。

前記FAODとしては、下記式(1)に示す反応を触媒するFAODであることが好ましい。



前記式(1)において、 R^1 は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基(糖残基)を示す。前記糖残基(R^1)は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基(R^1)は、グルコース残基(アルドース残基)となる。この糖残基(R^1)は、例えば、



で示すことができ、 n は、0～6の整数である。

前記式(1)において、 R^2 は、特に制限されないが、例えば、糖化アミノ酸、糖化ペプチドまたは糖化タンパク質の場合、 α -アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基が糖化されている場合とで異なる。

前記式(1)において、 α -アミノ基が糖化されている場合、 R^2 は

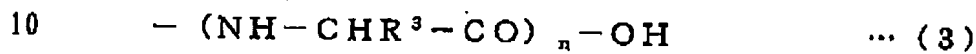
WO 02/27331

PCT/JP01/08484

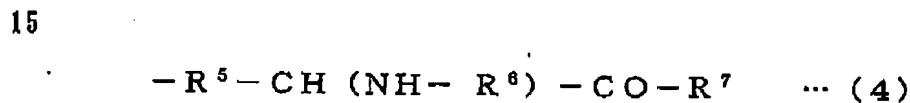
、下記式（２）で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。



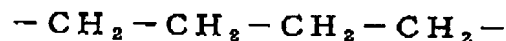
5. 前記式（２）において、 R^3 はアミノ酸側鎖基を示す。また、 R^4 は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式（３）で示すことができる。下記式（３）において、 n は、０以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。



また、前記式（１）において、 α -アミノ基以外のアミノ基が糖化されている（アミノ酸側鎖基が糖化されている）場合、 R^2 は下記式（４）で示すことができる。

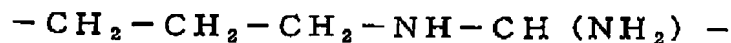


- 前記式（４）において、 R^6 は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 R^6 は



であり、

例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 R^6 は、



25 である。

また、前記式（４）において、 R^6 は、水素、アミノ酸残基またはペ

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

プチド残基であり、例えば、下記式（５）で示すことができる。なお、下記式（５）において、 n は０以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。



また、前記式（４）において、 R^2 は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式（６）で示すことができる。なお、下記式（６）において、 n は０以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。



図面の簡単な説明

15 図１は、本発明の測定方法の一実施例において、Triton X-100存在下で溶血試料とWST-3とを反応させた時の吸光度の経時変化を示すグラフである。

図２は、本発明の測定方法の前記実施例において、Tween 20存在下で溶血試料とWST-3とを反応させた時の吸光度の経時変化を示すグラフである。

図３は、本発明の測定方法の前記実施例において、ポリオキシエチレングリコールラウリルエーテル存在下で溶血試料とWST-3とを反応させた時の吸光度の経時変化を示すグラフである。

図４は、比較例において、界面活性剤無添加の条件下で溶血試料とWST-3とを反応させた時の吸光度の経時変化を示すグラフである。

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

発明を実施するための最良の形態

つぎに、本発明の測定方法について、血球中の糖化タンパク質を測定する例をあげて説明する。

まず、全血をそのまま溶血し、または全血から遠心分離等の常法により分離した血球画分を溶血し、溶血試料を調製する。この溶血方法は、
5 特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用でき、この中でも前記界面活性剤を用いる方法が好ましい。

溶血用の界面活性剤としては、特に制限されないが、操作の簡便性の
10 点から、後述するテトラゾリウム化合物による前処理と同様の界面活性剤を使用することが好ましい。前記溶血処理の条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が、1～10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.01～5重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で、数秒（約5秒）～10分程度攪拌すればよい。

15 つぎに、界面活性剤存在下において、前記溶血試料に対し前記テトラゾール環構造を有するテトラゾリウム化合物を添加し、前記溶血試料の前処理を行なう。

前記界面活性剤としては、前述のような界面活性剤が使用できる。具体的には、例えば、ポリオキシエチレン-*p*-*t*-オクチルフェニルエーテルである市販のT r i t o n系界面活性剤等、ポリオキシエチレンソル
20 ビタンアルキルエステルである市販のT w e e n系界面活性剤等、ポリオキシエチレンアルキルエーテルである市販のB r i j系界面活性剤等が使用できる。この他に、例えば、ポリオキシエチレン（10）ラウリルエーテル、商品名N i k k o l B L-9 E X（ポリオキシエチレン
25 の重量平均重合度Nが9；和光純薬工業社製）等のようなポリオキシエチレン（9）ラウリルエーテル、商品名T e r g i t o l N P X（ポ

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

リオキシエチレンの重量平均重合度Nが約10.5：ナカライテスク社製）および商品名Tergitol NP-40（ポリオキシエチレンの重量平均重合度Nが20：ナカライテスク社製）等のようなポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル等も使用できる。

- 5 前記界面活性剤の添加割合は前述と同様である。具体的には、前処理溶液中の血球濃度が、1～10体積%の場合、界面活性剤濃度2～150mmol/Lの範囲であり、好ましくは5～100mmol/Lの範囲であり、特に好ましくは10～50mmol/Lの範囲である。なお、前記溶血試料の調製（溶血処理工程）において、この前処理と同様の
- 10 界面活性剤を使用する場合、前記溶血処理工程において、予め、この前処理に必要な濃度になるように前記界面活性剤を添加しておいてもよい。また、溶血処理前の試料に、テトラゾリウム化合物および前記界面活性剤を共に添加して、溶血処理と前処理とを同時に行ってもよい。

- 前記テトラゾリウム化合物としては、前述のようなものが使用でき、
- 15 その添加割合は、例えば、前処理溶液中の血球濃度が、1～10体積%の場合、濃度0.02～2000mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.1～1000mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.4～200mmol/Lの範囲である。具体的に、前記テトラゾリウム化合物が 2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジ
- 20 ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩の場合、濃度0.02～80mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.1～20mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.2～15mmol/Lの範囲である。

- 前記テトラゾリウム化合物は、そのまま使用してもよいが、操作の簡
- 25 便性や処理効率等の点から、溶媒に溶解したテトラゾリウム化合物溶液として使用することが好ましい。前記溶液の濃度は、テトラゾリウム化

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

合物の種類（例えば、分子量等）等により適宜決定でき、例えば、0.01~120 mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.1~50 mmol/Lの範囲、より好ましくは0.2~20 mmol/Lの範囲である。前記溶媒としては、例えば、蒸留水、生理食塩水、緩衝液等が使用
5 でき、前記緩衝液としては、例えば、後述の緩衝液等が使用できる。

この前処理は、通常、緩衝液中で行われる。前記緩衝液としては、例えば、アミン系緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、ならびにCHES、CAPSおよびCAPSO等のグッド緩衝液等が使用でき、好ましくはアミン系緩衝液およびCHES緩衝液である。前記アミン系緩衝液
10 の緩衝剤としては、例えば、グリシン、エチルアミン、ジエチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリスヒドロキシアミノメタン、トリエタノールアミン、グリシンアミド等があげられ、好ましくは、グリシン、グリシンアミド、トリエタノールアミンである。

15 前記緩衝液のpHは、pH7~12の範囲が好ましく、より好ましくはpH8~11の範囲であり、特に好ましくはpH8~10の範囲である。

この前処理の条件は、特に制限されないが、通常、温度10~37℃の範囲であり、処理時間10秒~60分の範囲である。

20 つぎに、この前処理済み溶血試料に対し、プロテアーゼ処理を行う。これは、後の処理に使用するFAODを測定対象物の糖化部分に作用し易くするためである。

前記プロテアーゼとしては、例えば、セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、メタロプロテイナーゼ等が使用でき、具体的には、メ
25 ロプロテアーゼ、トリプシン、プロテナーゼK、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、ズブチリシン、エラスターゼ、アミノペプチダー

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

ぜ、ペプシン等が使用できる。

また、糖化タンパク質が糖化ヘモグロビンの場合は、前記糖化Hbを選択的に分解する、プロメライン、ババイン、ブタ膵臓由来トリプシン、メタロプロテイナーゼ、Bacillus subtilis由来
5 のプロテアーゼ等が好ましく、より好ましくはメタロプロテイナーゼ、プロメライン、ババインであり、特に好ましくはメタロプロテイナーゼである。このように、選択的に分解するプロテアーゼを使用すれば、糖化Hb分解物を選択的に調製でき、他の糖化タンパク質が分解され難いため、測定精度をさらに向上できるからである。前記Bacillus
10 subtilis由来プロテアーゼとしては、商品名プロテアーゼN（例えば、フルカ社製）、商品名プロテアーゼN「アマノ」（天野製薬社製）等があげられる。前記メタロプロテイナーゼとしては、Bacillus属由来メタロプロテイナーゼ（EC 3. 4. 24. 4）（例えば、東洋紡社製：商品名トヨチーム）等があげられる。

15 プロテアーゼ処理の条件は、例えば、使用するプロテアーゼの種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

具体的には、例えば、前記プロテアーゼとしてプロテアーゼKを用いて前記前処理済み溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のプロテアーゼ濃度10～30, 000mg/L（1KU/L～260MU/L）、
20 反応液中の血球濃度0.05～15体積%、反応温度15～37℃、反応時間1分～24時間、pH6～12の範囲である。このプロテアーゼ処理は、通常、緩衝液中で行われる。前記緩衝液としては、例えば、前記前処理と同様の緩衝液が使用できる。

25 また、例えば、前記プロテアーゼとしてメタロプロテアーゼを用いて前記前処理済み溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のプロテアー

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

ぜ濃度0.02g/L(40KU/L~40MU/L)、反応液中の血球濃度0.05~15体積%、反応温度15~37℃、反応時間1分~24時間、pH6~12の範囲である。

つぎに、前記プロテアーゼ処理により得られた分解物を、前記FAOD
5 Dで処理する。このFAOD処理により、前記式(1)に示す反応が触媒される。

このFAOD処理は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中で行うことが好ましい。その処理条件は、使用するFAODの種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される
10 。

具体的には、例えば、反応液中のFAOD濃度50~50,000U/L、反応液中の血球濃度0.01~1体積%、反応温度15~37℃、反応時間1~60分、pH6~9の範囲である。前記緩衝液の種類も特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

15 つぎに、前記FAOD処理で生成した過酸化水素を、酸化還元酵素および前記酸化により発色する発色性基質を用いて酸化還元反応により測定する。

前記酸化還元酵素としては、例えば、POD等が使用できる。

前記発色性基質としては、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム、オルトフェニレンジアミン(OPD)、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげらる。前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン
25 誘導体等があげらる。また、前記アミノアンチピリンの他に、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアソ

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

リノンヒドラゾン (MBTH)、スルホン化メチルベンズチアソリノン
ヒドラゾン (SMBTH) 等も使用できる。このような発色性基質の中
でも、特に好ましくは、前述のように、N-(カルボキシメチルアミノ
カルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナ
トリウムである。

前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、前記生
成した過酸化水素の濃度等により適宜決定される。通常、反応液中の酸
化還元酵素濃度 10~100,000 IU/L、発色性基質濃度 0.0
05~30 mmol/l、反応温度 15~37℃、反応時間 6秒~30
分、pH 5~9 である。また、前記緩衝液は、特に制限されず、例えば
、前記プロテアーゼ処理および FAD 処理等と同様の緩衝液等が使用
できる。

前記酸化還元反応において、例えば、前記発色性基質を用いた場合、
前記反応液の発色程度(吸光度)を分光光度計で測定することにより、
過酸化水素の量を測定できる。そして、この過酸化水素濃度と検量線等
とを用いて、試料中の糖化タンパク質量を求めることができる。

なお、前記過酸化水素量は、前記 POD 等を用いた酵素的手法の他に
、例えば、電気的手法により測定することもできる。

この測定方法において、前記テトラゾリウム化合物による前処理工程
は、前述のように、酸化還元反応が実質的に生じる前であれば、特に制
限されないが、前記 FAD 処理後に過酸化水素が発生することから、
前記 FAD 処理前に行なうことが好ましい。また、各処理工程は、前
述のように別々に行ってもよいが、例えば、以下に示すような組み合わ
せで同時に行ってもよい処理工程がある。

- 25 1: 溶血処理+前処理
 2: 溶血処理+前処理+プロテアーゼ処理

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

3 : プロテアーゼ処理 + F A O D 処理

4 : F A O D 処理 + 発色反応

5 : プロテアーゼ処理 + F A O D 処理 + 発色反応

また、テトラゾリウム化合物と界面活性剤の添加順序や、前記 F A O
5 D、酸化還元酵素および発色性基質の添加順序も特に制限されない。

このような方法によれば、前記試料にテトラゾリウム化合物を接触させることにより、G S H、A s A、ジチオスレイトール、システイン、N-アセチル-システイン等の低分子量還元物質だけでなく、特にヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の還元物質としての影響を十分に排除
10 除することができる。そして、併せて、テトラゾリウム化合物とヘモグロビンとの混在による濁りの発生を防止できる。このため、例えば、前述の吸光度測定になんら影響与えることなく、高精度で測定を行うことができる。

また、前記テトラゾリウム化合物による前処理工程において、例えば
15 、前記テトラゾリウム化合物以外の酸化剤を、さらに併用してもよい。前記酸化剤としては、例えば、ヨード酢酸ナトリウム、ヨース酸、過ヨウ素酸等のハロゲン酸化物、E D T A - F e、アスコルビン酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ等が使用できる。このような酸化剤の添加量は、例えば、試料 1 μ L 当たり 0. 0 0 1 ~ 0. 1 m g の範囲である。
20

本発明の測定方法において、測定対象物は、酸化還元反応を利用するものであれば、特に制限されず、前記糖化タンパク質の他に、前述のように、糖化ペプチド、糖化アミノ酸、グルコース、コレステロール、尿酸、クレアチニン、サルコシン、グリセロール等があげられる。

25 過酸化水素を発生させて、前記各測定対象物の量を測定する場合は、例えば、前記グルコースにはグルコースオキシダーゼを、前記コレステ

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

ロールにはコレステロールオキシダーゼを、前記尿酸にはウリカーゼを、前記クレアチニンにはサルコシンオキシダーゼを、前記サルコシンにはサルコシンオキシダーゼを、前記グリセロールにはグリセロールオキシダーゼを、それぞれ作用させて過酸化水素を発生させればよい。この

5 過酸化水素量の測定方法は、前述と同様にして行なうことができる。また、糖化ペプチド、糖化アミノ酸は、例えば、前記糖化タンパク質の測定と同様にして測定できる。

また、前記テトラゾリウム化合物による試料中のヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の処理後、測定対象物由来の還元物質を発生させ、

10 この量を酸化還元反応により測定し、この測定値から、前記測定対象物の量を決定する場合は、例えば、以下に示すようにして測定を行なうことができる。

例えば、前記測定対象物がグルコースの場合、例えば、 NAD^+ や NADP^+ 等の存在下、グルコースデヒドロゲナーゼを用いて、 NADH や NADPH 等の還元物質を発生させる。そして、前記測定対象物由来の還元物質である NADH や NADPH を、例えば、ジアホラーゼと、還元により発色する基質とを用いて、酸化還元反応により測定する。そして、前述のように、この測定対象物由来の還元物質の濃度と検量線等とを用いて、試料中の測定対象物の量を求めることができる。また、例

15 20

例えば、測定対象物がコレステロールの場合はコレステロールデヒドロゲナーゼを、サルコシンの場合は、サルコシンデヒドロゲナーゼをそれぞれ使用できる。

前記還元により発色する基質としては、特に制限されないが、例えば、前記試料中のヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の影響を排除する

25

ために添加した発色性のテトラゾリウム化合物を用いてもよい。また、各測定波長に応じて、前記試料の前処理に使用したものとは違う種類

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

- の発色性のテトラゾリウム化合物を使用してもよい。前記発色性のテトラゾリウム化合物の他には、例えば、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール等も使用できる。なお、より優れた信頼性の測定値を得るために、例えば、前記測定対象物由来の還元物質を測定する前に、予め
- 6 吸光度を測定しておくことが好ましい。

(実施例)

つぎに、実施例について比較例と併せて説明する。

10 (実施例1)

この実施例は、各種界面活性剤存在下、血球試料をテトラゾリウム化合物で前処理し、濁りの有無を調べた例である。以下に、使用した試料、試薬および方法を示す。

15 (試料の調製)

健常人の全血を採取し、これを遠心分離(1500G(3000rpm)、3分間)して血球を回収し、この血球に31倍体積量の精製水を添加して希釈および溶血を行ったものを測定試料とした。

20 (界面活性剤溶液)

下記表1に示す各種界面活性剤を精製水に溶解し、2.4重量%の界面活性剤溶液をそれぞれ調製した。

- 下記表1に示す界面活性剤において、商品名TritonX-100、商品名Brij35、商品名Nikkol BL-9EXおよび2,
- 25 4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウムは和光純薬工業社製、商品名TritonX-114、商品名TritonN-101、商品名T

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

ween 20、商品名Tergitol NPX、商品名Tergitol NP-40、ポリエチレングリコールラウリルエーテル、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウム、商品名PEG1000および商品名PEG6000はナカライテスク社製、商品名Brij 58、商品名Brij 98および商品名Arlasolve 200はSIGMA社製、商品名ブルランPI-20は林原研究所社製である。

(緩衝液)

CHES緩衝液 (pH9.0)

0.2mol/L

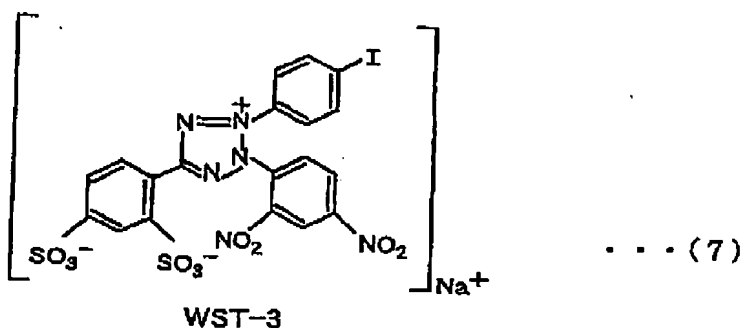
10

(WST-3溶液 : 以下同じ)

濃度が1.66mmol/Lになるように、下記化学式(7)に示す2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムモノナトリウム塩(商品名WST-3、同仁化学研究所社製)を精製水に溶解して調製した。

15

20



25

(濁りの確認方法)

測定試料345μL、界面活性剤溶液150μL、緩衝液300μL

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

およびWST-3溶液900 μ Lを混合し、37℃で5分間インキュベートした後、この混合液の濁りを目視により確認し、下記評価基準により評価した。なお、比較例として、界面活性剤の代わりに精製水を添加した以外は同様に調製した混合液についても、同様に評価を行った。これらの結果を下記表1に示す。

(濁りの評価)

○： 濁りが生じない
×： 濁りが生じた

10

25

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

(表 1)

界面活性剤		濁りの評価
(比較例 1)		
5	界面活性剤無添加	×
(実施例 1)		
	TritonX-100	○
	TritonX-114	○
	TritonN-101	○
10	Tween20	○
	Brij35	○
	Brij58	○
	Brij98	○
	Tergitol NPX	○
15	Tergitol NP-40	○
	Arlasolve 200	○
	ポリエチレングリコールラウリルエーテル	○
	デオキシコール酸	○
	Nikkol BL-9EX	○
20	ラウリル硫酸ナトリウム	○
	ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウム	○
	2, 4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウム	○
	ブルランPI-20	○
	PEG1000	○
25	PEG6000	○

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

前記表1に示すように、界面活性剤存在下でWST-3処理することによって、濁りの発生を防止できた。

(実施例2、比較例2)

- 5 この実施例は、界面活性剤の添加量を変えて、テトラゾリウム化合物処理を行った例である。以下に使用した試料、試薬および方法等を示す。

(測定試料の調製)

- 10 前記実施例1と同様にして回収した血球（ヘモグロビン濃度約300 g/L）に22倍体積量の精製水を添加して、希釈および溶血を行い、測定試料（ヘモグロビン濃度約13.6 g/L）を調製した。

(界面活性剤溶液)

- 15 実施例1と同じ界面活性剤を所定の濃度（1.0重量%および2.4重量%）になるように、それぞれ0.2 mol/L CHES緩衝液（pH 9.0）に溶解した。

- 20 前記測定試料を精製水で2倍希釈した希釈液25 μ L、界面活性剤溶液15 μ LおよびWST-3溶液45 μ Lを混合し、37℃で3分間インキュベートした。混合液中の界面活性剤の終濃度は、0.176重量%および0.424重量%である。インキュベート後、前記混合液について、波長884 nmにおける吸光度の測定および前記実施例1と同様にして濁りの評価を行った。また、比較例2として、界面活性剤無添加の条件下、前述と同様にして吸光度測定および濁りの評価を行った。この結果を下記表2に示す。

25

27

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

(表 2)

		終濃度		濁りの評価
		0.176重量%	0.424重量%	
5	界面活性剤	(Abs.)	(Abs.)	
	(比較例 2)			
	界面活性剤無添加	0.075		×
	(実施例 2)			
	TritonX-100	0.007	0.007	○
10	TritonN-101	0.018	0.013	○
	Tween20	0.035	0.032	○
	Brij35	0.017	0.012	○
	Brij58	0.009	0.011	○
	Brij98	0.009	0.011	○
15	Tergitol NPX	0.008	0.007	○
	Tergitol NP-40	0.007	0.007	○
	Arlasolve 200	0.008	0.008	○
	ホ [®] リエチレング [®] リコ-ルラウリルエ-テル	0.007	0.007	○
	Nikkol BL-9EX	0.015	0.011	○
20	ラウリル硫酸ナトリウム	0.011	0.017	○
	ラウリルヘ [®] ンセ [®] ンスルホン酸ナトリウム	0.011	0.017	○
	2,4-ジ [®] メチルヘ [®] ンセ [®] ン			
	スルホン酸ナトリウム	0.012	0.012	○
	フ [®] ルランPI-20	0.007	0.008	○
25	PEG1000	0.008	0.009	○
	PEG6000	0.007	0.008	○

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

また、T r i t o n X-100、T w e e n 20およびポリオキシエチレングリコールラウリルエーテルをそれぞれ用いた実施例について、884nm、845nmおよび805nmにおける吸光度を測定したタイムコースを図1～図3に示す。図1はT r i t o n X-100のタイムコース、図2はT w e e n 20のタイムコース、図3はポリオキシエチレングリコールラウリルエーテルのタイムコースを示す。比較例として、界面活性剤無添加の条件におけるタイムコースを図4に示す。

前記表2に示すように、界面活性剤存在下でW S T-3処理すれば、濁りを生じることがなく、また、界面活性剤無添加の場合に比べて、吸光度は低く保たれていた。また、図4の比較例におけるタイムコースでは、吸光度の増加が顕著に見られるのに対して、界面活性剤を添加した図1～図3の実施例のタイムコースでは、十分に吸光度が減少し、濁りによる影響が排除されたことがわかる。

15 (実施例3、比較例3)

この実施例は、界面活性剤存在下で、糖化アミノ酸を添加した溶血試料をW S T-3処理し、前記糖化アミノ酸の測定を行った例である。

(酸化還元反応試薬)

20	P O D (東洋紡社製)	132 KU/L
	F A O D (旭化成社製)	44 KU/L
	商品名D A-64 (和光純薬工業社製)	0.088 mmol/L
	リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0)	0.2 mol/L

25 (糖化バリン溶液の調製)

従来公知の方法により糖化バリン (以下、「F V」という) を作製し

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

、これを精製水に溶解して糖化バリン溶液を調製した。

(界面活性剤溶液)

商品名TritonX-100、商品名Nikkol BL-9EX
5 および商品名Tween20を、所定の濃度(1.0重量%および2.4重量%)になるように、それぞれ0.2mol/L CHES緩衝液(pH9.0)に溶解した。

(試料の調製)

10 実施例1と同様にして回収した血球に、22倍体積量となるように前記FV溶液を添加して、希釈および溶血を行い、これを試料とした。なお、試料は、Hb濃度およびFV濃度の異なる下記4種類(a~d)を調製した。

15		FV濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	Hb濃度 (g/L)
	試料 a	9	6.8
	試料 b	9	13.6
	試料 c	36	6.8
	試料 d	36	13.6

20

(測定方法)

前記試料12.5 μL に精製水12.5 μL を加え、さらに界面活性剤溶液15 μL を添加してから、前記WST-3溶液45 μL を添加して、37℃で3分間インキュベートした。この混合液に前記酸化還元反
25 応試薬25 μL 添加して1分間反応させ、反応後の吸光度(主波長751nmおよび884nm)を測定した。この反応溶液中における界面活

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

性剤の最終濃度は、0.114重量%と0.273重量%である。また、比較例3として、界面活性剤の代わりに前記CHES緩衝液を用いて同様に吸光度測定を行った。これらの結果を下記表3に示す。

- 下記表中において、界面活性剤濃度の単位%は重量%を示す。また、
- 5 表中のかっこ内の数値(%)は、試料bおよびd(Hb濃度13.6g/L)の吸光度を、それぞれ試料aおよびc(Hb濃度6.8g/L)の吸光度で割った値(b/a 、 d/c)の百分率(%)を示し、100%に近い程測定精度に優れることになる。つまり、試料中のFV量は一定であるため、Hb量が二倍になってもFVに依存する吸光度(発色量)
- 10)が同程度であり、100%に近ければ、濁りの発生を十分に防止し、FVを高精度に測定できたといえる。

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

(表 3)

			実施例3				比較例3	
試料	FV	Hb	TritonX-100		NikkolBL-9BX			
	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$	0.114%	0.273%	0.114%	0.273%		
5	<u>波長751nm</u>							
	a	9	6.8	0.066	0.063	0.062	0.058	0.069
	b	9	13.6	0.057	0.058	0.055	0.051	0.074
	c	36	6.8	0.202	0.184	0.201	0.201	0.192
10	d	36	13.6	0.189	0.182	0.185	0.185	0.179
	<u>波長884nm</u>							
	a	9	6.8	0.004	0.004	0.004	0.004	0.019
	b	9	13.6	0.008	0.006	0.007	0.007	0.040
15	c	36	6.8	0.006	0.006	0.006	0.006	0.020
	d	36	13.6	0.009	0.008	0.008	0.008	0.044
	<u>波長751nm-884nm</u>							
	a	9	6.8	0.062	0.058	0.058	0.054	0.050
20	b	9	13.6	0.049	0.052	0.048	0.045	0.034
				(79%)	(89%)	(82%)	(83%)	(68%)
	c	36	6.8	0.197	0.179	0.195	0.195	0.172
	d	36	13.6	0.180	0.174	0.176	0.177	0.135
			(92%)	(97%)	(90%)	(91%)	(78%)	

前記表 3 に示すように、界面活性剤存在下で W S T - 3 処理した実施例 3 では、濁りの発生が防止され、また、特に 8 8 4 n m における H b の吸収が低減された。このため、界面活性剤非存在下の比較例 3 に比べ

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

てかっこ内の値(%)が高く、高精度で測定できたことがわかる。

産業上の利用可能性

- 5 以上のように、本発明の測定方法は、界面活性剤存在下で、前記テトラゾリウム化合物を試料に添加することにより、試料中の還元物質の影響を排除でき、かつ、テトラゾリウム化合物とヘモグロビン等の還元物質との混在による濁りの発生も防止できるため、信頼性に優れた測定を行なうことができる。したがって、本発明の測定方法は、例えば、臨床医療における各種分析に適用でき、特に、糖尿病診断において重要である、赤血球中の糖化ヘモグロビン等の糖化タンパク質の測定に有用である。
- 10

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

請 求 の 範 囲

1. 試料中の測定対象物を酸化還元反応を用いて測定する方法であつて、前記酸化還元反応に先立ち、界面活性剤の存在下、試料にテトラゾ
5 リウム化合物を添加して前記試料中の還元物質の影響を排除し、その後、前記測定対象物由来の還元物質または酸化物質の量を酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定する測定方法。
2. 試料がヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物を含む試料であつて、前記試料中のヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の還元物質と
10 しての影響を排除する請求の範囲 1 記載の測定方法。
3. 酸化還元反応による測定が、前記反応により生じた発色物質の吸光度測定である請求の範囲 1 記載の測定方法。
4. 発色物質が、酸化還元酵素を用いて、還元物質または酸化物質と発色性基質とを酸化還元反応させることにより発色した発色性基質であ
15 る請求の範囲 3 記載の測定方法。
5. 吸光度測定における測定波長が、650～900 nm の範囲である請求の範囲 3 記載の測定方法。
6. 吸光度測定における主波長が650～800 nm の範囲であり、副波長が前記主波長より大きくかつ730～900 nm の範囲である請
20 求の範囲 3 に記載の測定方法。
7. 界面活性剤が、非イオン性界面活性剤、アルキル硫酸塩および高分子化合物からなる群から選択された少なくとも一つの界面活性剤である請求の範囲 1 記載の測定方法。
8. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン鎖と炭化水素鎖と
25 がエーテル結合したポリオキシエチレンエーテルである請求の範囲 7 記載の測定方法。

WO 02/27331

PCI/JP01/08484

9. ポリオキシエチレン鎖の重量平均重合度が8～23の範囲であり、炭化水素鎖の炭素数が8～18の範囲である請求の範囲8記載の測定方法。
10. 炭化水素鎖が、アルキル基およびアルキルフェニル基の少なくとも一方の基から構成される請求の範囲8記載の測定方法。
11. 炭化水素鎖が、分岐鎖を有する請求の範囲8記載の測定方法。
12. 高分子化合物が、水溶性ゼラチン、プルラン、ポリエチレングリコールおよびポリビニルピロリドンからなる群から選択された少なくとも一つの化合物である請求の範囲7記載の測定方法。
13. 界面活性剤を、試料1mLあたり0.05～5molの範囲になるように添加する請求の範囲1記載の測定方法。
14. 界面活性剤を、テトラゾリウム化合物1mol当たり0.2～1.5molの範囲になるように添加する請求の範囲1記載の測定方法。
15. テトラゾリウム化合物が、テトラゾール環の2位および3位にベンゼン環を有し、前記ベンゼン環のうち少なくとも一方が、ハロゲン基、カルボキシ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選択された少なくとも一つの官能基を有する請求の範囲1記載の測定方法。
16. テトラゾリウム化合物が、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩である請求の範囲1記載の測定方法。
17. 測定対象物由来の酸化物質が過酸化水素であり、発色性基質として酸化により発色する発色性基質を使用し、前記過酸化水素と前記発色性基質とを酸化還元酵素によって酸化還元反応させる請求の範囲3記載の測定方法。
18. 測定試料が血球を含む請求の範囲1記載の測定方法。

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

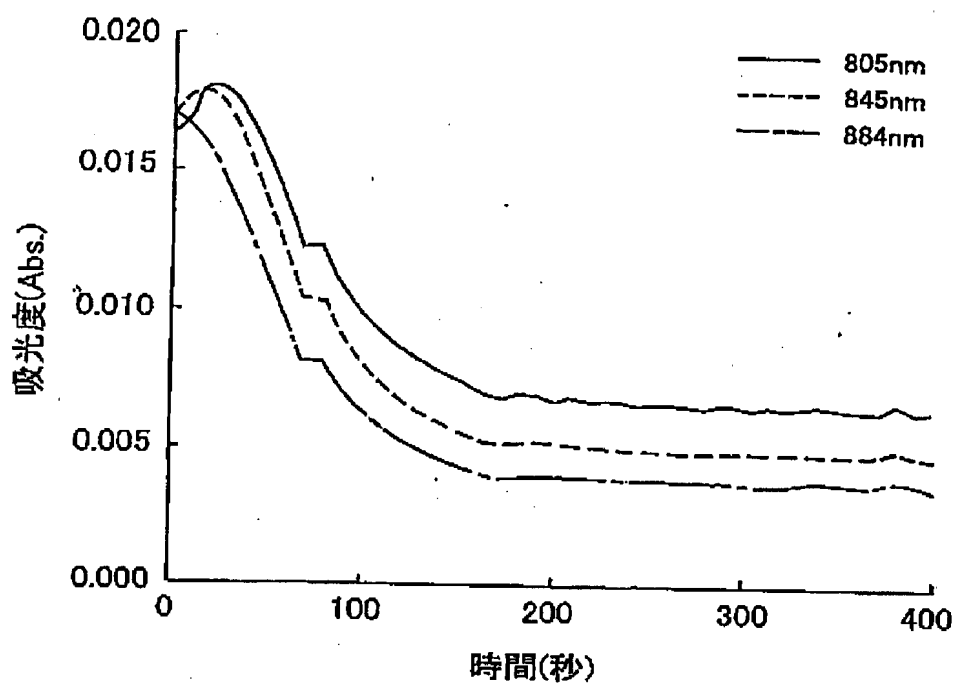
19. 測定対象物が、糖化タンパク質である請求の範囲1記載の測定方法。

20. 測定対象物が、糖化ヘモグロビンである請求の範囲1記載の測定方法。

5

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

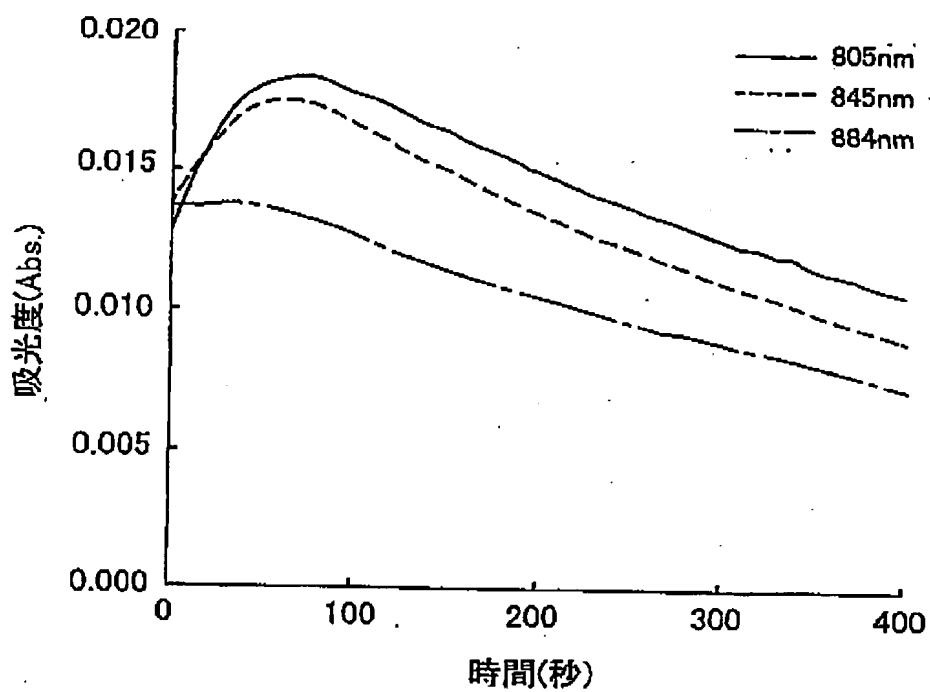


F i g . 1

1 / 4

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

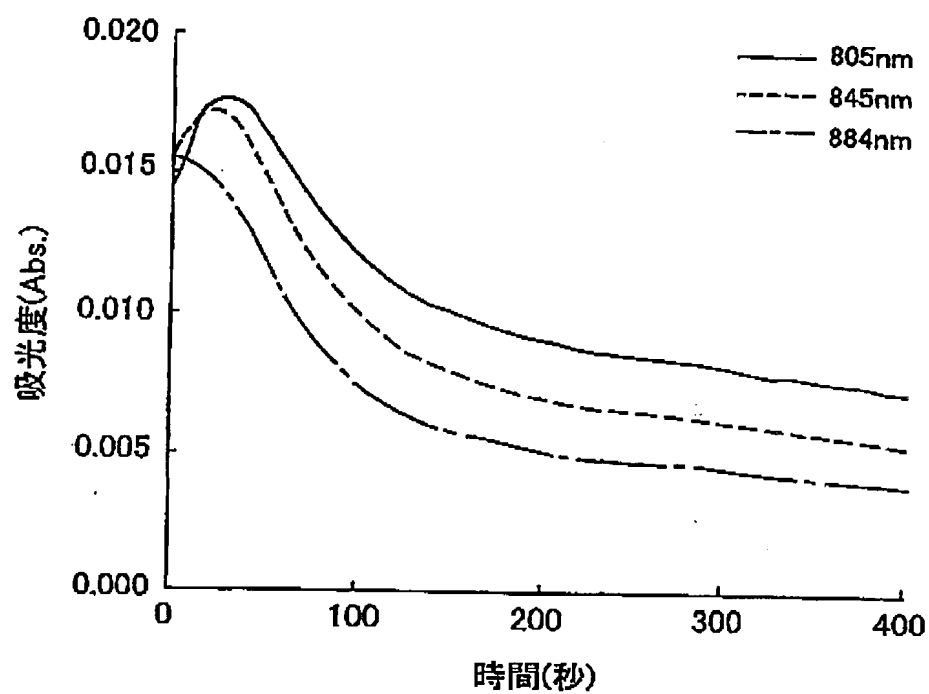


F i g . 2

2 / 4

WO 02/27331

PCT/JP01/08484

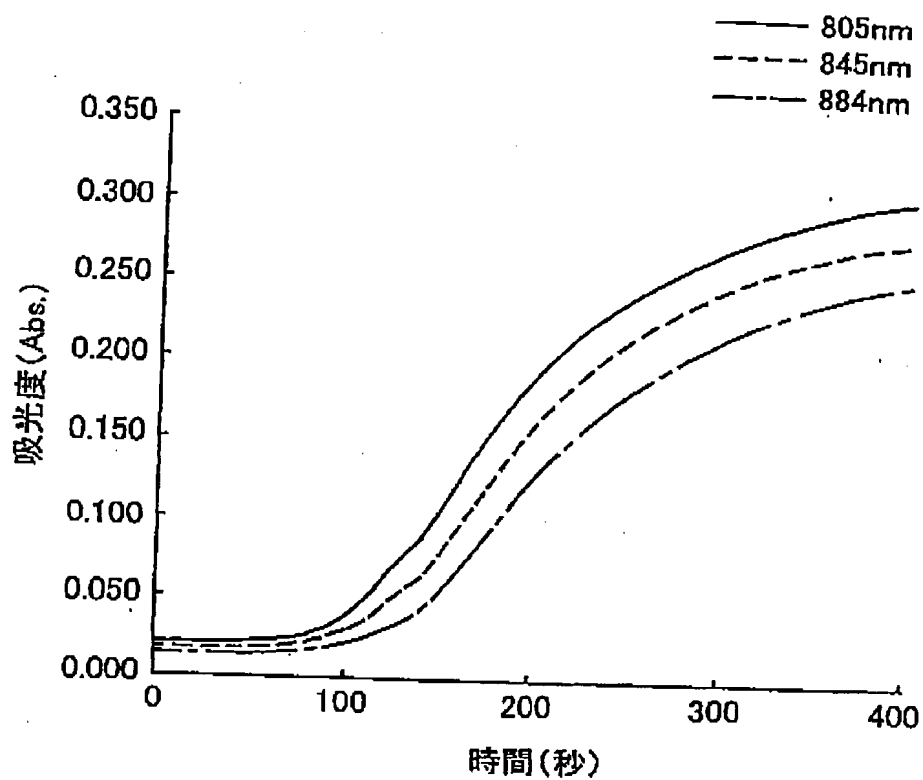


F i g . 3

3 / 4

WO 02/27331

PCT/JP01/08484



F i g . 4

4 / 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/08484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/72, G01N21/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/48-33/98, G01N21/75-21/83

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (tetrazorium*surfactant)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-210100 A (KDK CORPORATION), 02 August, 2000 (02.08.00), Column 7, line 45 to Column 12, line 38, & EP 1002874 A2	1-20
Y	JP 09-329598 A (KDK CORPORATION), 22 December, 1997 (22.12.97), Column 3, line 45 to Column 7, line 49, & EP 811844 A1 & US 5955027 A	1-20
Y	JP 2000-93197 A (Hoomatto K.K.), 04 April, 2000 (04.04.00), Column 7, line 24 to Column 12, line 23, (Family: none)	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"B" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 December, 2001 (11.12.01)

Date of mailing of the international search report
25 December, 2001 (25.12.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO1/08484
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. G01N33/72, G01N21/78		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. G01N33/48-33/98, G01N21/75-21/83		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年		
日本国公開実用新案公報 1971-2001年		
日本国登録実用新案公報 1994-2001年		
日本国実用新案登録公報 1996-2001年		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICSTファイル (テトラソリウム*カイクメンカッセイザイ)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2000-210100 A(株式会社京都第一科学)02.8月.2000 (02.08.00), 第7欄第45行~第12欄第38行 & EP 1002874 A2	1-20
Y	JP 09-329598 A(株式会社京都第一科学)22.12月.1997 (22.12.97), 第3欄第45行~第7欄第49行 & EP 811844 A1 & US 5955027 A	1-20
Y	JP 2000-93197 A(株式会社ホームメット)04.4月.2000 (04.04.00), 第7欄第24行~第12欄第23行 & ファミリーなし	1-20
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に拠る提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 11.12.01		国際調査報告の発送日 25.12.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番8号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松本 征二 電話番号 03-3581-1101 内線 3250

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

整理番号: 124451 発送日: 平成19年 3月13日 1.
拒絶理由通知書 ↑
Mailing Date

特許出願の番号	特願2004-513779
起案日	平成19年 3月 8日
特許庁審査官	竹中 靖典 3312 2J00
特許出願人代理人	特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ 様
適用条文	第29条第1項、第29条第2項、第36条

この出願は、次の理由によって拒絶をすべきものである。これについて意見があれば、この通知書の発送の日から60日以内に意見書を提出して下さい。

理 由

(理由1)

この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において、頒布された下記の刊行物に記載された発明又は電気通信回線を通じて公衆に利用可能となった発明であるから、特許法第29条第1項第3号に該当し、特許を受けることができない。

(理由2)

この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において、頒布された下記の刊行物に記載された発明又は電気通信回線を通じて公衆に利用可能となった発明に基いて、その出願前にその発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第29条第2項の規定により特許を受けることができない。

(理由3)

この出願は、特許請求の範囲の記載が下記の点で、特許法第36条第6項第1号に規定する要件を満たしていない。

(理由4)

この出願は、特許請求の範囲の記載が下記の点で、特許法第36条第6項第2号に規定する要件を満たしていない。

(理由5)

この出願は、発明の詳細な説明の記載が下記の点で、特許法第36条第4項に規定する要件を満たしていない。

記 (刊行物等は刊行物等一覧参照)

整理番号: 124451 発送日: 平成19年 3月13日 2
理由 1、2 について

- ・ 請求項 1 ～ 19
- ・ 第 1 刊行物
- ・ 第 2 刊行物
- ・ 第 3 刊行物 (請求項 1・3・4、【0029】)
- ・ 第 4 刊行物

第 1 刊行物には、酵素によって糖化ヘモグロビンから過酸化水素を発生させ、過酸化水素にペルオキシダーゼと呈色試薬を作用させて発色させ、発色を測定することにより糖化ヘモグロビンを測定すること、ニトロ基を有するテトラゾリウム化合物、スルホン酸化合物の界面活性剤で試料を処理することが記載されている。

また、第 1 刊行物には、ヘモグロビンが還元物質として作用し、測定に影響を与えることが記載されており、第 1 刊行物に記載の方法を、ヘモグロビンの還元作用による障害を回避するために使用される亜硝酸塩 (第 2 刊行物) によって、ヘモグロビンの還元物質としての影響を排除する構成とすることに困難性は認められない。

第 3 刊行物には、テトラゾリウム化合物を添加して試料中の還元物質の影響を排除し、測定対象物質を酸化還元反応により測定する測定対象物の量を決定する測定方法が記載されている。また、テトラゾリウム化合物がニトロ基、スルホ基を含むこと、ヘモグロビンを含む試料で測定を行うことが記載されている。

第 4 刊行物には、ヘモグロビンが測定に与える誤差を回避するために、スルホン酸化合物を添加することが記載されている。

理由 3 について

(1) 請求項 1 ～ 4、6 ～ 19 には、スルホン酸化合物を加えてヘモグロビンによる影響を回避することが記載されている。一方発明の詳細な説明には、SLS、SDBS、ABSA、ANDS、DADS がヘモグロビンによる影響を回避できることが示されている (表 1) が、これらの化合物がヘモグロビンによる影響を回避できることをもってスルホン酸化合物であればヘモグロビンによる影響を回避できるということはできず、請求項に記載の範囲にまで一般化することができないため、請求項 1 ～ 4、6 ～ 19 は発明の詳細な説明に実質的に記載されたものではない。

(2) 請求項 1 ～ 19 には、ニトロ化合物を加えてヘモグロビンによる影響を回避することが記載されている。一方発明の詳細な説明には、2, 4-DNA、p-NA、p-NP、NaNO₂ がヘモグロビンによる影響を回避できることが示

整理番号: 発送番号:124451 発送日:平成19年 3月13日 3

されている(表2)が、これらの化合物がヘモグロビンによる影響を回避できることをもってニトロ化合物であればヘモグロビンによる影響を回避できるということはできず、請求項に記載の範囲にまで一般化することができないため、請求項1～19は発明の詳細な説明に実質的に記載されたものではない。

(3) 請求項1～19には、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも二方を試料に添加して、ヘモグロビンの影響を回避するとあるが、(表1)に示されているSDBSは2, 4-DNAと同時に用いた場合しか測定が行われておらず、SDBSだけを添加してもヘモグロビンの影響を回避できるとはいえない。また、(表1)、(表2)を通して、いずれのニトロ化合物についてもニトロ化合物のみを添加した場合については示されておらず、ニトロ化合物だけを添加してもヘモグロビンの影響を回避できるとはいえない。

したがって、請求項1～19における、SDBSやニトロ化合物だけを添加することについては発明の詳細な説明に実質的に記載されたものではない。

理由4について

(4) 請求項1を引用する請求項2には、「前記測定対象物由来の酸化物質または還元物質」とあるが、請求項1には「前記測定対象物由来の酸化物質」とあり、還元物質は記載されていないため、記載が適切ではない。

(5) 請求項1～12を引用する請求項13には、「前記酸化により発色する基質」とあるが、「酸化により発色する基質」を含まない請求項も引用しており、記載が適切ではない。

(請求項14についても同様である。)

理由5について

(6) 表2にニトロ化合物としてアジ化ナトリウムが載せてあるのは不適切ではないか。

(なお、【0093】と表2で化合物が一致していないのも不自然ではないか。)

刊 行 物 等 一 覧

1. 国際公開第02/027331号パンフレット
2. 特開2001-292795号公報
3. 特開2000-210100号公報
4. 特開昭60-168050号公報

← References

先行技術文献調査結果の記録

整理番号: 発送番号:124451 発送日:平成19年 3月13日 4/E

・調査した分野 I P C G 0 1 N 3 3 / 4 8 ~ 3 3 / 9 8

・先行技術文献 特開 2 0 0 0 - 5 0 8 9 6 号公報

この先行技術文献調査結果の記録は、拒絶理由を構成するものではない。
なお、補正をする際は新規事項の追加とならないよう留意して下さい。

また、出願人が不測の不利益を受ける事態を避けるために、補正する場合はその補正の根拠となる記載が出願当初明細書のどの部分にあるのかを意見書等において指摘することも検討して下さい。

この拒絶理由通知の内容に関するお問い合わせ、または面接のご希望がございましたら下記までご連絡下さい。

連絡先 特許審査第一部材料分析 三木 隆
(電話) 03-3581-1101 内線 3252